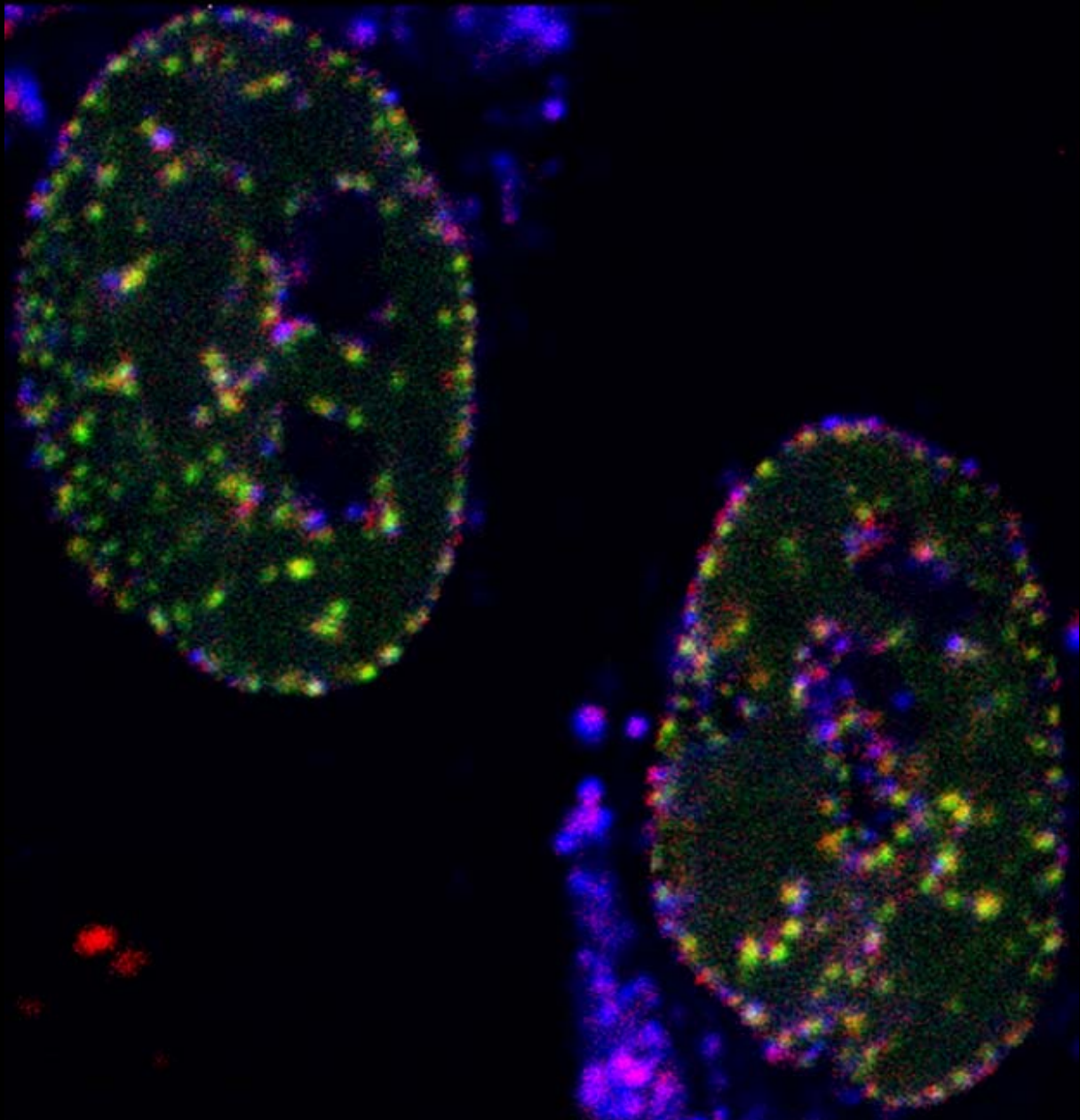


Untersuchungen zur Organisation der Transkription und DNA-Replikation im Kontext der Chromatinarchitektur im Kern von Säugerzellen

Dissertation von Nicolas Sadoni



Untersuchungen zur Organisation der Transkription und DNA-Replikation im Kontext der Chromatinarchitektur im Kern von Säugerzellen

Dissertation

An der Fakultät für Biologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Nicolas Sadoni
aus München
am 22.7.2003

**Untersuchungen zur Organisation der Transkription und DNA-Replikation im Kontext
der Chromatinarchitektur im Kern von Säugerzellen**

Dissertation an der LMU München

vorgelegt von
Dipl. Biol. Nicolas Sadoni
aus München

Gutachter:
PD Dr. Daniele Zink
Prof Dr. Dirk Eick

Tag der mündlichen Prüfung: 31.10.2003

Inhalt

1. Einleitung	10
1.1 Die Organisation der Chromosomen	10
1.2 Das Chromosomen-Territorien/Interchromatin-Kompartiment Modell (CT/IC-Modell)	14
1.3 Das Spleißfaktor-Kompartiment	16
1.4 Der Prozess der DNA-Replikation im Kern von Säugerzellen	18
1.5 Zielsetzung	20
2. Material und Methoden	21
2.1 Material	21
2.1.1 Medien	21
2.1.2 Puffer, Lösungen, Reagentien	21
2.1.3 Fixative	23
2.1.4 DNA-Farbstoffe	23
2.1.5 Nukleotide	24
2.1.6 Antikörper	25
2.1.7 Bakterien	25
2.1.8 Zelllinien	26
2.1.9 Zubehör für mikroskopische Präparate	26
2.1.10 Lebendzellkammer und Mikroskopie	26
2.1.11 Mikroinjektionsanlage und Zubehör	28
2.1.12 Software	29
2.2 Methoden	30
2.2.1 Herstellung kompetenter Zellen	30
2.2.2 Transformation von Escherichia coli	30
2.2.3 Plasmidpräparation zur Gewinnung größerer Mengen an Plasmid-DNA	30
2.2.4 Zellkultur	32
2.2.5 Synchronisation	32
2.2.6 Transfektion von Säugerzellen	33
2.2.7 BrdU-Markierung	33
2.2.8 Markierung naszenter RNA mit BrUTP	33
2.2.9 Mikroinjektion	34
2.2.10 Scratch Replication Labeling (SRL)	34
2.2.11 Fixierungen und Einbettung	35
2.2.12 Immunfärbungen	35
2.2.13 BrdU-Nachweis mit Hilfe von DNase	36

2.2.14 Lebendzellmikroskopie	36
2.2.15 Aufnahmen am Epifluoreszenzmikroskop	38
2.2.16 Aufnahmen am konfokalen Laserscanningmikroskop	39
2.2.17 Bildanalyse	40
2.2.17.1 Kolokalisationsanalyse von RNA und H2B-GFP markiertem Chromatin	40
2.2.17.2 Analyse einer „Region of Interest“ (ROI) bezüglich der Intensitäten unterschiedlicher Fluoreszenzsignalen	40
2.2.17.3 Visuelle Inspektion der GFP-PCNA-Foci und der fluorochrommarkierten DNA-Foci	41
2.2.17.4 Abstandsmessungen zwischen GFP-PCNA-Foci und zwischen GFP-PCNA-Foci und Cy3-markierten Foci	41
2.2.17.5 Kolokalisationsanalyse betreffend GFP-PCNA-Foci und Cy3-markierte Foci	42
2.2.18 Erstellung von 3D Rekonstruktionen und Filmsequenzen	42
3. Ergebnisse	43
3.1 Die Lokalisierung von naszenter RNA bezüglich chromatinarmer Räume im Zellkern	43
3.1.1 Bestimmung der Kolokalisation von Chromatin und naszenter RNA	43
3.1.2 Bestimmung der Lokalisation naszenter RNA mit Hilfe von Fluoreszenzintensitätsprofilen	48
3.1.3 Pseudo-3D-Darstellungen der Verteilung naszenter RNA im Verhältnis zu Chromatin	50
3.2 Untersuchungen zu den topologischen Beziehungen von Speckles und DNA im Zellkern	51
3.2.1 Speckles sind mit früh replizierendem Chromatin assoziiert	51
3.2.2 Kontrolle der Lokalisation des Fusionsproteins	52
3.2.3 Die Assoziation von Speckles mit unterschiedlichen DNA-Fraktionen	53
3.2.4 Die Verteilung der DNA und des dtra-GFP Proteins innerhalb der Speckles	56
3.2.5 Analyse der Assoziation von unterschiedlichen DNA-Fraktionen mit Speckles mit Hilfe von Fluoreszenzintensitätsprofilen	60
3.3 Untersuchungen zur dynamischen Interaktion der Replikationsmaschinerie mit DNA in lebenden Zellen	63
3.3.1 Untersuchung der Dynamik von Replikationsfoci	63
3.3.2 Die Interaktion von DNA und Replikationsfoci in lebenden Zellen	67
3.3.2.1 Die Dynamik der naszenten DNA-Synthese	67
3.3.2.2 Die Interaktion der Replikationsmaschinerie mit zu replizierender DNA	75

4. Diskussion	83
4.1 Die Lokalisation naszenter RNA im Zellkern	83
4.2 Die Interaktion von Speckles mit funktionell unterschiedlichen Chromatinfraktionen	85
4.3 Organisation und Dynamik der DNA-Replikation	87
4.3.1 Die Dynamik der Replikationsmaschinerie	87
4.3.2 Die Interaktion von DNA und der Replikationsmaschinerie	88
4.3.3 Die Stabilität subchromosomaler Foci	88
5. Zusammenfassung	93
6. Referenzen	95
7. Abkürzungen	106
8. Danksagung	108
9. Lebenslauf	109

1. Einleitung

In den letzten Jahren wurden im Hinblick auf die Entschlüsselung der linearen DNA-Sequenzen komplexer Genome große Fortschritte erzielt. So war im Jahre 2001 die „Draft“-Sequenz des menschlichen Genoms veröffentlicht worden (Lander et al., 2001; Venter et al., 2001) und im Jahre 2002 die „Draft“-Sequenz der Maus (Waterston et al., 2002). Trotzdem sind die Möglichkeiten nach wie vor beschränkt, die Funktionsweise komplexer Genome zu verstehen. So ist es schwierig, die koordinierte Aktivierung beziehungsweise Inaktivierung von vielen tausend Genen in unterschiedlichen Zelltypen auf der Basis der DNA-Sequenz zu verstehen. Dieses Problem ist wahrscheinlich auch dadurch bedingt, dass das Genom innerhalb einer Zelle nicht als lineare DNA-Sequenz, sondern als räumliche Struktur vorliegt. Diese Struktur kodiert wahrscheinlich auch regulatorische Informationen (Bridger et al., 2000; Francastel et al., 2000; Galy et al., 2000; Gasser, 2001). Daher ist es wichtig, zu verstehen, wie ein Genom im Zellkern topologisch organisiert ist, und was mögliche grundlegende Prinzipien der Kernarchitektur sind. Da die funktionelle Organisation von Genomen im Zellkern offensichtlich dynamisch ist, ist es außerdem wichtig, dynamische Reorganisationsprozesse im Zusammenhang mit funktionellen Änderungen, wie sie zum Beispiel während des Zellzyklus oder während der Zelldifferenzierung auftreten, zu untersuchen.

1.1 Die Organisation der Chromosomen

Der Zellkern war als intrazelluläre Struktur 1802 durch Franz Bauer entdeckt worden. Er zog viel Aufmerksamkeit auf sich durch das faszinierende, komplexe und ästhetische Verhalten der Chromosomenkondensation vor der Zellteilung, sowie durch seine hervorstechende Rolle bei so essentiellen Prozessen wie der Befruchtung und der Vererbung (Harris, 1999). Die während der Mitose kondensierten Chromosomen konnten am Mikroskop einzeln beobachtet werden. Dies war jedoch während der Interphase nicht möglich. Daher war lange unklar, wie die Chromosomen im Interphasezellkern strukturiert und organisiert waren. So wurde über viele Jahre hinweg kontrovers diskutiert, ob Chromosomen im Interphasekern als Individuum, wie während der Mitose, weiterhin vorliegen, oder ob sie sich wie „Spaghetti“ durchmischen.

Es wurde Ende des 19. Jahrhunderts postuliert, dass Chromosomen während des gesamten Zellzyklus ihre Individualität bewahren würden (Boveri, 1909; Rabl, 1885). Weitere Analysen ihrer nukleären Substruktur waren auf Grund des begrenzten Methodenspektrums schwierig. Da man individuelle Chromosomen innerhalb des Zellkerns im Elektronenmikroskop nicht erkennen konnte, wurde in den 60er und 70er Jahren die Idee favorisiert, dass die Chromatinfibern von unterschiedlichen Chromosomen sich im Nukleoplasma wie „Spaghetti in einer Suppe“ vermischen würden (Comings, 1968; Vogel und Schroeder, 1974). Als dann die Prozesse der Genexpression experimentell manipulierbar und analysierbar wurden, wurden die Prozesse im Zellkern hauptsächlich mit Hilfe von biochemischen und molekularbiologischen Ansätzen untersucht. Vor dem Hintergrund dieser Untersuchungen trat das Interesse an der Kernarchitektur ins Abseits.

In den 80er Jahren erneuerte die Fluoreszenzmikroskopie von Proteinen in fixierten Zellen das Interesse der Kernarchitektur wieder (Spector, 1993a). Hier war zum Beispiel mit Smith(Sm)-Antikörpern aus Seren von Patienten mit Autoimmunkrankheiten gezeigt worden, dass sich im Zellkern sogenannte Kernkörperchen nachweisen ließen

(Lerner et al., 1981; Perraud et al., 1979; Spector et al., 1983). Diese Befunde belebten die Vorstellung wieder, dass das Nukleoplasma eine geordnete Strukturierung aufweisen könnte. Es wurde dann in den 80er Jahren gezeigt, dass individuelle Chromosomen definierte Territorien innerhalb des Zellkerns besetzen. Durch UV-Bestrahlung begrenzter Bereiche des Zellkerns und der darauf folgenden Identifizierung einzelner beschädigter Chromosomen wurden die ersten starken experimentellen Hinweise geliefert, dass Chromosomen in Interphasekernen tatsächlich als individuelle, voneinander getrennte Strukturen vorliegen (Cremer et al., 1982). Des weiteren zeigte das „Chromosome Painting“ mit Hilfe neu entwickelter Techniken der „Fluoreszenz in Situ Hybridisierung“, dass die Chromosomen in Interphasekernen als diskrete Territorien vorlagen (Cremer et al., 1988; Lichter et al., 1988; Schardin et al., 1985).

Schließlich wurde durch verschiedene andere Visualisierungstechniken gezeigt, dass auch in lebenden Zellen Chromosomenterritorien vorhanden sind. So führte die Technik der Markierung der DNA durch fluoreszierende Nukleotide während der S-Phase und die darauffolgende Segregation der markierten Schwesterchromatiden durch mehrere Zellzyklen zur in vivo Visualisierung von einzelnen Chromosomenterritorien in Zellkernen (Manders et al., 1999; Zink et al., 1999; Zink et al., 1998). Dabei zeigte sich, dass die Chromosomenterritorien der untersuchten Zelltypen über einen Zeitraum von mehreren Stunden positionell weitgehend stabil waren und wenig Dynamik zeigten (Bornfleth et al., 1999; Zink et al., 1998).

Eine andere Methode, große wie kleine Chromosomenbereiche zu visualisieren, bedient sich des grünen fluoreszierenden Proteins (GFP) der Qualle *Aequorea victoria*. Durch die genomische Integration von Lac-Operator Sequenzen in eukaryontischen Zellen, die gleichzeitig auch ein GFP-Lac-Repressor Fusionsprotein exprimieren, können spezifische chromosomale Loci mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie beobachtet werden (Belmont et al., 1999). Damit ist es möglich, sogenannte Homologous Staining Regions (HSR) von einer Größenordnung bis zu 90 Megabasenpaare (Mbp) auf einem Chromosom darzustellen (Tumbar et al., 1999). Die HSRs werden durch Amplifizierung der Lac-Operator-Sequenzen erzeugt. Aber auch Replikationsursprünge, Zentromere und Telomere in Hefe (Heun et al., 2001a; Heun et al., 2001b), sowie einzelne Loci in menschlichen Zellen (Chubb et al., 2002) können mit dieser Methode visualisiert werden.

Eine mögliche reproduzierbare Anordnung beziehungsweise Verteilung der Chromosomenterritorien im dreidimensionalen Raum des Interphasekerns ist auf verschiedene Arten untersucht worden. Ein Ansatz bediente sich der Untersuchung der Anordnung von homologen Chromosomen in Prometaphasekernen. Zu diesem Zeitpunkt liegen die Chromosomen in Form einer Rosette vor, und aus den Anordnungen der homologen Chromosomen zueinander in dieser Rosette wurden Rückschlüsse auf deren räumliche Beziehung zueinander im Interphasekern gezogen. Die Befunde reichten von hoch geordneten Anordnungen in Rosetten von Prometaphase Chromosomen, in denen die Homologen immer auf der gegenüberliegenden Seiten der Rosette lagen (Nagele et al., 1995), über kaum geordneten Anordnungen der Homologen, die zufällig in der Rosette der Prometaphase angeordnet waren (Allison und Nestor, 1999), bis hin zu zelltypisch bedingten Anordnungen (Chandley et al., 1996). Daher war es schwierig, diese Befunde zu interpretieren.

Eine engere Korrelation wurde zwischen der Lokalisierung von Chromosomenterritorien und der Größe menschlicher Chromosomen gezeigt, wobei die kleineren menschlichen Chromosomen eher im Inneren, und die größeren menschlichen Chromosomen mehr an der Peripherie des Zellkerns lagen (Sun et al., 2000). Ein wichtiger Faktor bei

der Lokalisierung von Chromosomenterritorien scheint die Gendichte der einzelnen Chromosomen zu sein (Boyle et al., 2001; Croft et al., 1999). Für zwei etwa gleich große Chromosomen, das genarme menschliche Chromosom 18 und das genreiche menschliche Chromosom 19, wurde gezeigt, dass das genreichere Chromosom 19 mehr im Kerninneren lokalisierte (Croft et al., 1999). Dagegen lokalisierte das genarme Chromosom 18 mehr an der Kernperipherie (Croft et al., 1999). Eine spätere Untersuchung der Lokalisation aller Chromosomen zeigte, dass generell die genreicheren Chromosomen eher im Zentrum des Kerns lokalisierten, während die genärmeren Chromosomen eher an seiner Peripherie positioniert waren (Boyle et al., 2001). Bei diesen Untersuchungen konnte keine Korrelation zwischen Chromosomengröße und deren Lokalisation gefunden werden (Boyle et al., 2001). Insgesamt legten diese Ergebnisse eine radiale Genomorganisation nahe, bei der genreiche Chromosomen eher zentral, und genarme Chromosomen eher peripher angeordnet sind (Boyle et al., 2001).

Daneben wurde gefunden, dass die Chromosomenorganisation im Zellkern eng korreliert ist mit dem Bandenmuster mitotischer Chromosomen. Die Banden mitotischer Chromosomen können mit dem Farbstoff Giemsa nach einer Trypsinbehandlung differentiell angefärbt werden. Daraus resultieren alternierende Muster aus sogenannten dunklen G-Banden und hellen G-Banden, wobei letztere auch weitgehend den R-Banden entsprechen. Schon seit vielen Jahren deuten unterschiedliche Befunde darauf hin, dass dunkle und helle G-Banden sich in ihrem GC-Gehalt unterscheiden (Craig and Bickmore, 1993 und Zitate darin). Diese Befunde wurden durch die Veröffentlichung der „Draft“-Sequenz des menschlichen Genoms bekräftigt (Lander et al., 2001). So wurde gezeigt, dass es große Bereiche mit einem ausgeprägten unterschiedlichen GC-Gehalt im menschlichen Genom gibt, die als GC-Domänen bezeichnet wurden. Es wurde eine statistisch signifikante Korrelation zwischen dem GC-Gehalt der Domänen und hellen und dunklen G-Banden gefunden. In den dunklen G-Banden liegt der GC-Gehalt bei circa 37%, während er bei den hellen G-Banden (R-Banden) bei circa 45% liegt (Lander et al., 2001). Daneben unterscheiden sich die hellen und dunklen G-Banden nicht nur in ihrer DNA-Sequenz, sondern auch in ihren funktionellen Eigenschaften. So haben sie unterschiedliche Replikationszeitpunkte während der S-Phase (Camargo und Cervenka, 1982; Dutrillaux et al., 1976; Kondra und Ray, 1978).

Ein weiterer Unterschied liegt in der Gendichte der hellen und dunklen G-Banden. Die früh-replizierenden R-Banden besitzen eine hohe Gendichte und beinhalten Housekeeping-Gene, sowie gewebespezifische Gene (Saccone et al., 1996; Saccone et al., 1993). Die spät-replizierenden G-Banden sind genarm und beinhalten weitgehend gewebespezifische Gene (Craig und Bickmore, 1993; Craig und Bickmore, 1994). Die höchste Gendichte wird in einer Fraktion der R-Banden, den sogenannten T-Banden gefunden (Saccone et al., 1992). Diese haben auch einen besonders hohen GC-Gehalt, und es ist gezeigt worden, dass ein hoher GC-Gehalt mit einer hohen Gendichte korreliert (Lander et al., 2001; Saccone et al., 1996).

Diese Banden mitotischer Chromosomen bleiben während der Interphase erhalten. So sind Chromosomenterritorien in diskrete Domänen organisiert, die den Banden mitotischer Chromosomen entsprechen (Zink et al., 1998). Es wurde gezeigt, dass die R-/T-Banden in der Interphase im Kerninneren lokalisiert sind (Sadoni et al., 1999). Dagegen sind die G-Banden hauptsächlich an den nukleären und nukleolären Peripherien lokalisiert (Sadoni et al., 1999). Die C-Banden, die heterochromatischen Regionen entsprechen, wurden sowohl an der Kernperipherie als auch im Kerninneren gefunden. Der spezifischen Kernlokalisierung der R-/T-Banden und der G-/C-Banden

liegt eine polare Organisation der Interphasechromosomen zugrunde (Ferreira et al., 1997; Sadoni et al., 1999). Durch die Zusammenlagerung der einzelnen polaren Chromosomenterritorien entsteht im Inneren des Zellkerns ein Kompartiment, das vorwiegend R-Banden-Domänen enthält, während an den nukleären und nukleolären Peripherien Kompartimente entstehen, die vorwiegend G-Banden-Domänen enthalten (Sadoni et al., 1999). Diese unterschiedlichen Kompartimente unterscheiden sich auch funktionell bezüglich der Replikation, Transkription und Histon-Azetylierung. Die R-/T-Banden, die im Inneren des Zellkerns liegen, werden in der frühen S-Phase repliziert, während die G-/C-Banden, die an den Peripherien des Zellkerns und der Nukleoli liegen, zu einem späteren Zeitpunkt in der S-Phase repliziert werden (Camargo and Cervenka, 1982; Dutrillaux et al., 1976; Kim et al., 1975; Ferreira et al., 1997; Sadoni et al., 1999). Neben dem Unterschied im Replikationszeitpunkt unterscheiden sich diese Kompartimente auch in der transkriptionellen Aktivität. Durch eine gleichzeitige Markierung von naszenter RNA und DNA mit einem spezifischen Replikationszeitpunkt wurde gezeigt, dass das innere, früh-replizierende Kompartiment der R-/T-Banden eine globale transkriptionelle Aktivität zeigt, während die peripheren, später-replizierenden Kompartimente der G-/C-Banden keine transkriptionelle Aktivität aufwiesen (Sadoni et al., 1999). Des weiteren zeigte sich, dass diese Eigenschaften auch noch eng mit der Histon-Azetylierung korrelierten. Es war gezeigt worden, dass hyperazetyliertes Histon H4, welches in transkriptionell aktivem Chromatin angereichert ist (Hassig und Schreiber, 1997; Jeppesen, 1997; Utley et al., 1998) bevorzugt mit dem früh-replizierenden und transkriptionell aktiven inneren Kompartiment assoziiert ist, aber nicht mit den später-replizierenden, peripheren und transkriptionell inaktiven Kompartimenten (Sadoni et al., 1999). Diese Ergebnisse legen eine radiale Organisation nahe und stimmen sehr gut mit den Befunden überein, dass genreiche Chromosomen mehr im Inneren des Zellkerns positioniert sind, während genärmere Chromosomen mehr an der Peripherie des Zellkerns vorliegen (Boyle et al., 2001).

Vor dem Hintergrund der höher-geordneten Kompartimente im Zellkern stellt sich die Frage, wie die zugrunde liegenden Chromatinstrukturen aufgebaut sind. Bis heute ist wenig darüber bekannt, wie höher-geordnete Chromatinstrukturen im Zellkern beschaffen sind. Da die Gesamtlänge der DNA eines haploiden Chromosomensatzes von Säugetieren eine Länge von circa 1 Meter besitzt (Passarge, 1994), muss die lineare DNA gefaltet und kompaktiert werden, damit sie überhaupt in den Zellkern hineinpasst. Die bisher einzige gesicherte höher-geordnete Struktur ist die 10 nm Fiber (Olins et al., 1981; Olins et al., 1980; Richmond et al., 1984), aufgebaut aus Nukleosomen, die aus je einem Histonoktamer (bestehend aus den Histonen H2A, H2B, H3 und H4) und der darum gewundenen DNA (146 bp) bestehen. Der Verpackungsgrad dieser Struktur ist 7:1 und damit noch nicht ausreichend, um die gesamte DNA in einem Zellkern unterzubringen. Die nächste höher-geordnete Faltung der Nukleosomen könnte die 30 nm Fiber sein (Woodcock et al., 1984), die möglicherweise eine helikale Struktur mit sechs Nukleosomen pro helikaler Windung besitzt (Solenoidstruktur, (Lewin, 1997)). Die Existenz der 30 nm Fiber als Struktureinheit im Zellkern ist allerdings umstritten (Woodcock, 1994). Daneben gibt es Hinweise, die auf die Existenz von höher-geordneten („large scale“) Chromatin-Fibern deuten und hauptsächlich aus elektronenmikroskopischen Untersuchungen stammen (Belmont et al., 1989; Belmont und Bruce, 1994; Sedat und Manuelidis, 1978). Der Durchmesser dieser Strukturen bewegt sich in einer Größenordnung von ungefähr 250 nm in polytären Chromosomen von *Drosophila melanogaster* und circa 200 nm in diploiden Interphasekernen von Säugern. Diese 200 nm bis 250 nm dicken Fibern scheinen aus kleineren, aufgewickelten

Strukturen mit einem Durchmesser von 30 nm bis 50 nm zu bestehen (Belmont et al., 1989; Sedat und Manuelidis, 1978). Auch für menschliche Metaphasechromosomen wurden fiberartige Strukturen mit einem Durchmesser von circa 200 nm beschrieben, die in jedem Schwesterchromatid (Durchmesser 600 nm) senkrecht zur Längsachse gewickelt waren, und von in Interphasekernen gefundenen ähnlichen fiberartigen Strukturen nicht zu unterscheiden waren (Sedat und Manuelidis, 1978). Basierend auf diesen und anderen Befunden wurde folgendes hierarchische Modell entwickelt, um die fortschreitende Kompaktierung der DNA zu erklären: Der lineare DNA-Faden mit einem Durchmesser von 3 nm bildet mit den Histonen die 10 nm Fiber. Die Nukleosomenstruktur ist helikal gewunden und bildet so die 25 nm bis 30 nm Fiber (Solenoid), die sich wiederum in eine 60 nm bis 80 nm Fiber faltet. Eine weitere Kompaktierung erzeugt eine 100 nm bis 130 nm Fiber, die dann in weiteren Faltungsschritten in einen 600 nm Schwesterchromatidstrang übergehen könnte (Belmont und Bruce, 1994). Dem hierarchischen Fibermodell steht das Modell der fokalen Chromosomenorganisation gegenüber. Anhand von Replikationspulsmarkierungen mit Basenanaloga konnte gezeigt werden, dass zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der S-Phase unterschiedlich große sogenannte Replikationsfoci (RF) im Zellkern markiert werden (Berezney et al., 2000; Berezney et al., 1995; Ma et al., 1998; Nakamura et al., 1986; Nakayasu und Berezney, 1989; O'Keefe et al., 1992). Der Durchmesser der Replikationsfoci reicht von circa 300 nm in der frühen S-Phase bis über 1 µm in der späten S-Phase. Es wird angenommen, dass jeder Replikationsfokus im Durchschnitt circa 1 Megabasenpaar (Mbp) DNA enthält und ungefähr 5-10 einzelne Replikons umfasst, die synchron aktiv sind und als Replikoncluster bezeichnet werden (Berezney et al., 2000; Huberman und Tsai, 1973; Jackson und Pombo, 1998). Es wurde sowohl in lebenden, als auch in fixierten Zellen beobachtet, dass nach erfolgter Replikationsmarkierung während der S-Phase entsprechende Foci auch in darauffolgenden Zellzyklusstadien und Zellzyklen vorhanden sind. Daher wurde postuliert, dass diese Foci möglicherweise stabile DNA-Aggregate darstellen (Berezney et al., 1995; Jackson und Pombo, 1998; Ma et al., 1998; Meng und Berezney, 1991; Sparvoli et al., 1994; Zink et al., 1998). Weiterhin wurde postuliert, dass diese DNA-Aggregate als sogenannte subchromosomale Foci stabile Untereinheiten der chromosomalen Struktur darstellen, die in engem Bezug zur Bandenstruktur mitotischer Chromosomen stehen (Jackson und Pombo, 1998; Zink et al., 1999; Zink et al., 1998). Allerdings schließt eine mögliche Organisation der Chromosomen in stabile fokale Untereinheiten nicht unbedingt eine gleichzeitige Ordnung in höher-geordnete Fibern aus. Für eine Vereinbarkeit der beiden Modelle spricht der Befund, dass sich höher-geordnete Fibern anscheinend aus Foci mit unterschiedlichen Replikationszeitpunkten aufbauen (Sadoni et al., 2001).

1.2 Das Chromosomen-Territorien/Interchromatin-Kompartiment Modell (CT/IC-Modell)

Bezüglich der Zellkernarchitektur und der Organisation der einzelnen Komponenten des Zellkerns sind unterschiedliche Modelle entworfen worden (Belmont und Bruce, 1994; Comings, 1968; Cremer und Cremer, 2001; Cremer et al., 1995; Cremer et al., 1993; Misteli, 2001; Münkler et al., 1999). Auf ein wichtiges Modell, das sogenannte Chromosomen-Territorien/Interchromatin-Kompartiment Modell (CT/IC-Modell), das auf der Grundlage des Interchromatin-Domänen-Modells (ICD-Modell) entwickelt wurde, soll hier näher eingegangen werden. Das ICD-Modell wurde von Thomas Cremer,

Christoph Cremer und Peter Lichter postuliert (Cremer und Cremer, 2001; Cremer et al., 1995; Cremer et al., 1993; Kurz et al., 1996; Zirbel et al., 1993).

Das ICD-Modell stützte sich auf die experimentelle Beobachtung, dass die Chromosomen im Zellkern als distinkte Territorien vorliegen. Es wurde angenommen, dass diese als relativ kompakte Objekte vorliegen, zwischen denen, und an deren Oberfläche sich das sogenannte Interchromatin-Kompartiment (IC), auch „ICD-Space“ genannt, erstreckt (Cremer et al., 1993; Zirbel et al., 1993). Das IC wurde als ein dreidimensionales Kanalsystem definiert, das an den Kernporen beginnt und sich zwischen den Oberflächen der Chromosomenterritorien erstreckt. Es wurde postuliert, dass dieses dreidimensionale Kanalsystem durch elektrostatische Kräfte aufrecht erhalten wird. Dabei wurde davon ausgegangen, dass die Chromosomenterritorien negative Nettoladungen aufweisen und sich gegenseitig voneinander abstoßen. Makromolekulare Komplexe sollten sich in diesem Kanalsystem befinden, und es wurde angenommen, dass Chromosomenterritorien impermeabel für makromolekulare Komplexe seien. Zu diesen makromolekularen Komplexen sollten zum Beispiel die für DNA-Replikation, Transkription, Spleißen und DNA-Reparatur benötigten Komplexe zählen. Daher sollten zum Beispiel Gene nur dann transkribiert werden können, wenn sie an der Oberfläche beziehungsweise der Peripherie der Chromosomenterritorien lagen, denn nur hier konnten sie dem ICD-Modell zur Folge mit der Transkriptionsmaschinerie wechselwirken. Schließlich sollte die gespleißte RNA im IC mit Proteinen komplexiert werden und in diesem zu den Kernporen exportiert werden.

Das ICD-Modell wurde im Laufe der Zeit an neue experimentelle Befunde angepasst. So wurden in eine erweiterte Fassung des ICD-Modells (Cremer et al., 1995) Befunde für das Vorhandensein von Interchromatinkanälen (Blobel, 1985; Kramer et al., 1994; Razin und Gromova, 1995; Wansink et al., 1994b) mit eingebracht. Es wurde postuliert, dass sich der Interchromatinraum auch möglicherweise in die Chromosomenterritorien erstrecken könnte. Diese Hypothese wurde durch experimentelle Befunde gestützt, die zeigten, dass Transkription und Spleißen auch im Inneren von Chromosomenterritorien stattfinden kann (Abranches et al., 1998; Cmarko et al., 1999; Verschure et al., 1999). Aber auch nähere Untersuchungen von Chromosomenterritorien zeigten, dass diese eine komplex gefaltete Struktur inne haben. Diese Struktur zeigte eine komplex gefaltete Oberfläche mit chromatinfreien Bereichen auch im Inneren der Chromosomen-Territorien (Cremer et al., 2000; Solovei et al., 2000; Verschure et al., 1999).

Auf der Grundlage dieser Befunde wurde das ICD-Modell weiterentwickelt (Cremer und Cremer, 2001). Zum sogenannten Interchromatin-Kompartiment/Chromosomen-Territorien Modell (IC/CT-Modell) ist die Ausdehnung des IC neu definiert worden. Demnach dehnt es sich sowohl zwischen, als auch innerhalb der Chromosomenterritorien aus, bildet dort ausgedehnte Lagunen und endet in kleinsten Verzweigungen von wenigen Nanometern Durchmesser. Diese grenzen innerhalb der Territorien Chromatindomänen mit einem DNA-Gehalt von ungefähr 1 Mbp ab, die aus Chromatinschleifen mit circa 100 kb Länge aufgebaut sein sollen. Das IC/CT-Modell sagt vorher, dass einzelne Kernproteine oder kleine Proteinkomplexe auch in das Innere von kompakten Chromatindomänen eindringen können, dass aber die Diffusion von größeren Komplexen unterbunden wird (Cremer und Cremer, 2001). Interchromatin-Kanäle, die sich durch die Chromosomenterritorien ausdehnen (Visser et al., 2000), sollten kanalgebündelte Bewegungen solcher Komplexe durch Chromosomenterritorien ermöglichen. Laut Definition beinhaltet das IC nicht den zusätzlichen Interchromatin Raum zwischen Chromatinfibern im Inneren von kompakten Chromatindomänen. Dieser Raum sollte nicht-exprimierte Gene beinhalten, die allerdings durch Chromatin-Remodellierungs-

prozesse wieder in die Nähe des Interchromatin-Kompartiment gebracht werden können (Cremer und Cremer, 2001). Damit könnte laut IC/CT-Modell Transkription auch im Inneren von Chromosomen-Territorien, aber nicht im Inneren von Chromatindomänen stattfinden. Eine wichtige Vorhersage ist, dass makromolekulare Komplexe nach wie vor auf das IC beschränkt sein sollten unabhängig davon, ob die entsprechenden Kanäle sich innerhalb, oder zwischen Chromosomen-Territorien befinden.

1.3 Das Spleißfaktor-Kompartiment

Neben dem Chromatin beinhaltet der Zellkern von Säugern auch andere Strukturen, wie Nukleoli, unterschiedliche Klassen von sogenannten Kernkörperchen (Nuclear Bodies) und Speckles. Letztere werden auch als Spleißfaktor-Kompartiment bezeichnet, welches circa ~20 % des nukleären Volumens besetzt (Misteli und Spector, 1999; Spector, 1993a). Speckles bestehen aus Clustern von „Interchromatin Granula (IGCs)“ und „Perichromatin-Fibrillen“. Diese Strukturen wurden zuerst anhand von elektronenmikroskopischen Aufnahmen beschrieben. IGCs beinhalten eine Vielzahl kontrastreicher Partikel, die einen Durchmesser von je circa 20-25 nm haben. Sie bestehen aus Ribonukleoproteinpartikeln, die heterogene RNAs unterschiedlicher Größen beinhalten (Hendzel et al., 1998). Die größte Fraktion der heterogenen RNA ist polyA⁺-RNA unbekannter Funktion (Carter et al., 1991). Zusätzlich beinhalten IGCs unterschiedliche Faktoren, die bei der RNA-Synthese und RNA-Prozessierung eine Rolle spielen (Mintz et al., 1999). So kommen dort Spleißfaktoren wie zum Beispiel SF2/ASF (Splicing Factor 2/Alternative Splicing Factor) mit Arginin-Serin-reichen Domänen (sogenannte SR-Domänen) und SC-35 (Splicing Component, 35 kDa) vor, sowie die hyperphosphorylierte Form der großen Untereinheit der RNA-Polymerase II (Bregman et al., 1995). Des weiteren beinhalten IGCs auch Vorläufer-mRNA Faktoren (Beck, 1961; Spector, 1990; Spector et al., 1991), sowie sn(small nuclear)RNAs und auch Transkriptionsfaktoren (Larsson et al., 1995; Mortillaro et al., 1996; Zeng et al., 1997), 3'-prozessierende Faktoren (Krause et al., 1994; Schul et al., 1998) und ribosomale Proteine (Mintz et al., 1999).

Die Perichromatin-Fibrillen liegen an der Peripherie der IGCs und werden in Pulse-Chase Experimenten schnell mit [³H]-Uridin markiert, was den Schluss nahe legt, dass sie naszenter (Vorläufer)-mRNA entsprechen (Bachellerie et al., 1975; Fakan et al., 1976). Dagegen werden die IGCs in diesen Experimenten kaum bis gar nicht markiert, was den Schluss nahe legt, dass sich dort keine naszente RNA befindet (Fakan und Bernhard, 1971; Fakan und Nobis, 1978).

Die oben beschriebenen Feinstrukturen der Speckles lässt sich nur mit Hilfe der Elektronenmikroskopie auflösen. Vergleicht man die Ergebnisse lichtmikroskopischer Studien, zum Beispiel von Immunfluoreszenzstudien, mit diesen Daten, so scheint es, dass in der Immunfluoreszenz intensiver gefärbte Regionen mit den IGCs korrespondieren (Spector et al., 1991). Die schwächer gefärbten Regionen, die sich an der Peripherie der IGCs dagegen befinden, stellen wahrscheinlich die Perichromatin-Fibrillen dar (vergleiche auch Abbildung 1, Spector et al., 1991).

Die Funktion der Speckles ist bis jetzt noch unklar. Da sie jedoch viele Komponenten beinhalten, die für das Spleißen von RNA benötigt werden, wird angenommen, dass sie ein Reservoir für Spleißfaktoren darstellen (Spector et al., 1991; Wang et al., 1991). Alternativ dazu könnten sie auch direkt als funktionelle Strukturen dienen, an denen verstärkt das RNA-Spleißen stattfinden kann (Misteli, 2000). So ist gezeigt worden,

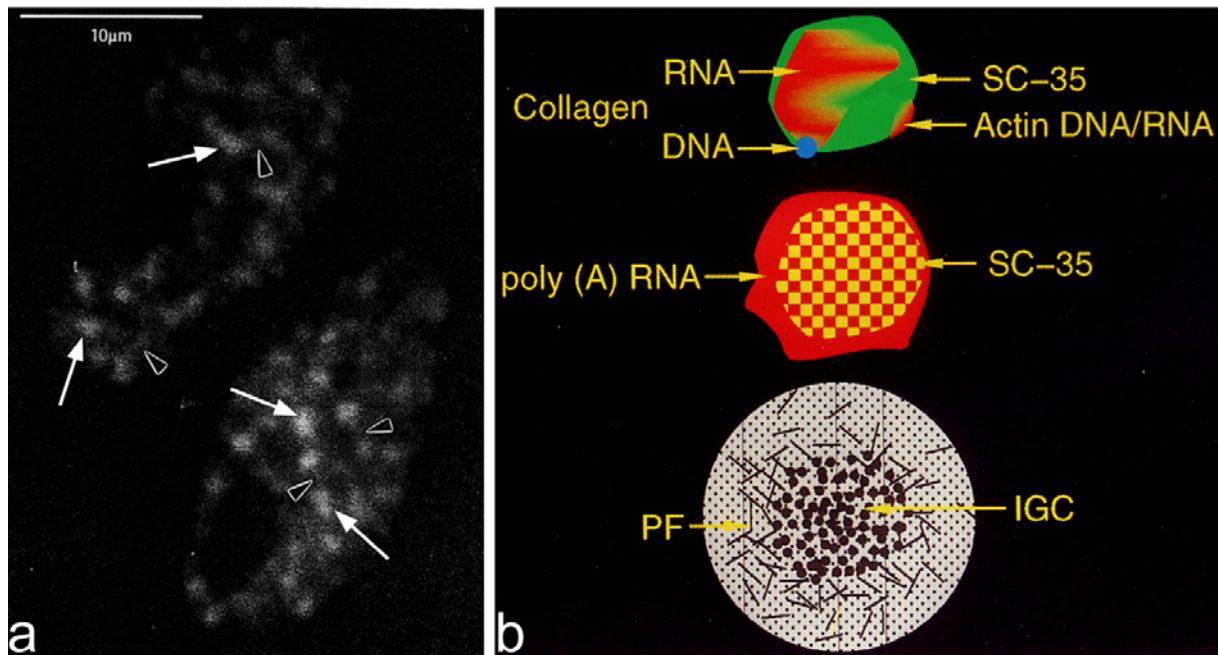


Abbildung 1

Die Abbildung in (a) stammt leicht verändert aus (Spector, 1993). Die Abbildung zeigt eine snRNP-Immunfärbung in PtK2-Zellen (Nierenzellen einer australischen Beutelratte). Speckles sind als circa 20-40 angefärbte Regionen pro Zellkern zu erkennen. Die stärker gefärbten Regionen entsprechen wahrscheinlich den „Interchromatin Granula Clusters“ (Pfeile). Die schwächer gefärbten Bereiche (Pfeilspitzen) stellen wahrscheinlich „Perichromatin-Fibrillen“ dar. Die Abbildung (b) stammt aus (Xing et al., 1995). Die Abbildung zeigt ein Modell zum Aufbau von Speckles, welches aufgrund von elektronen- und lichtmikroskopischer Beobachtungen aufgestellt wurde. Oben: Aktive Gene sind mit der Peripherie von Speckles assoziiert, die hohe Konzentrationen des essentiellen Spleißfaktor SC-35 (grün) enthalten. Die mRNA der mit der Peripherie der Speckles assoziierten Gene kann sich über den Speckle ausbreiten (Kollagen) oder auch auf seine Peripherie beschränkt bleiben (Aktin). Mitte: Speckles enthalten auch relativ hohe Mengen an poly(A)-RNA. Hohe Konzentrationen des Spleißfaktors SC-35 finden sich besonders im Zentrum der Speckles. Unten: Perichromatin-Fibrillen finden sich vorwiegend an der Peripherie von Speckles, während IGCs in deren Inneren befinden.

dass sich Extensionen von Speckles in Richtung viraler Gene ausbilden, nachdem diese induziert worden waren (Misteli et al., 1997). So bildeten sich Extensionen von Speckles in Richtung des ins Genom integrierten BK-Virus (Polyomavirus) in BKT-1B Zellen (Abkömmling der Baby Hamster Nieren (BHK)-Zellen) nach Induktion durch Zugabe von zyklischem Adeninmonophosphat (cAMP). Auch in Rattenzellen (R9 Zellen) konnte ein ähnliches Phänomen beim integrierten Cytomegalievirus (CMV) nach dessen Induktion durch Cycloheximid festgestellt werden (Misteli et al., 1997). Auch für weitere Gene, wie das β -Aktin Gen und das Kollagen I α 1 Gen (Xing et al., 1995), sowie das Myosin heavy chain (MyHC) und das Dystrophin Gen (Smith et al., 1999) war gezeigt worden, dass eine Assoziation mit dem Spleißfaktor-Kompartiment besteht, wenn diese Gene aktiv transkribiert werden.

Die Morphologie der Speckles im Lichtmikroskop zeigt irregulär geformte, ellipsoide Strukturen, die über den Zellkern verteilt sind. Die Organisation von Speckles in der Zelle ist allem Anschein nach dynamisch, und reflektiert den physiologischen Zustand der Zelle. Daher kann die Form und die Anzahl der Speckles im Zellkern variieren (Spector, 1993b). Die Morphologie der Speckles ist von der Aktivität der RNA Polymerase II abhängig. Nach Zugabe von α -Amanitin erscheinen sie abgerundet. Ebenso reagieren sie empfindlich auf Inhibitoren der Proteinkinasen (Staurosporine),

sowie der Ser/Thr-Phosphatasen (Okadaidsäure), indem sie ihre Extensionen verlieren (Staurosporine), oder sich Speckleskomponenten im Nukleoplasma anreichern (Misteli et al., 1997). Daneben haben „Fluorescence Recovery After Photobleaching“ (FRAP)-Experimente mit GFP-markierten Spleißfaktoren gezeigt, dass diese Proteine nicht statisch in Speckles immobilisiert werden (Kruhlak et al., 2000). Vielmehr diffundieren diese Proteine sehr schnell durch den Zellkern und erscheinen nur transient in den Speckles. Es wird angenommen, dass sich an den Speckles eine erhöhte Zahl von Bindungsstellen für die Spleißfaktoren befindet, so dass diese hier dynamisch angereichert werden können (Kruhlak et al., 2000). Dieses postulierte Gleichgewicht zwischen Diffusion und transients Bindung könnte auch erklären, warum insgesamt eine einhundert mal geringere Diffusionsrate gemessen wurde, als es aufgrund der Größe der Proteine erwartet würde (Kruhlak et al., 2000).

1.4 Der Prozess der DNA-Replikation im Kern von Säugerzellen

Neben Transkription und Spleißen ist ein weiterer essentieller Prozess im Zellkern die DNA-Replikation. Die DNA-Replikation findet während der sogenannten S-Phase des Zellzyklusses statt. Bei diesem Prozess wird die DNA verdoppelt, was eine Voraussetzung ist, dass bei der darauffolgenden Zellteilung beide Schwesterzellen eine identische Kopie des Erbguts erhalten. Im Säugetierzellkern findet die DNA-Replikation in so genannten Replikationsfoci statt. Die lichtmikroskopisch sichtbaren Replikationsfoci mit Durchmessern von circa 300 – 1000 nm beinhalten sämtliche für die DNA-Replikation wichtigen Proteine. Diese bilden makromolekulare Komplexe an den Orten aktiver DNA-Replikation (Leonhardt et al., 2000b). Diese funktionellen Komplexe von Replikationsproteinen beinhalten zum Beispiel eine DNA-Helikase, einen einzelsträngigen DNA-bindenden Proteinkomplex (single stranded DNA binding protein complex, entspricht „Replication Protein A“) (RPA) und die DNA-abhängige ATPase „Replikations-Faktor C“ (RFC), die als Aktivator der DNA-Polymerasen fungiert. RFC bindet auch an das 3'-Ende der Primer und begünstigt die koordinierte Synthese beider Stränge. Ebenso befinden sich in den makromolekularen Proteinkomplexen an den Replikationsfoci die DNA-Polymerasen, DNA-Ligase I, Topoisomerasen, Nukleasen und das „Proliferating Cell Nuclear Antigen“ (PCNA), welches die Verbindung der katalytischen Untereinheit der DNA-Polymerase δ mit der DNA vermittelt (Waga und Stillman, 1994). PCNA bildet einen homotrimeren Ring um die DNA (Wyman und Botchan, 1995). Die Replikationsfoci können durch Fusionen von PCNA mit GFP, sowohl in fixierten, als auch in lebenden Zellen dargestellt werden (Leonhardt et al., 2000a; Somanathan et al., 2001; Sporbert et al., 2002).

Neben den für die Replikation wichtigen Proteinen beinhalten die Replikationsfoci auch die zu replizierende, sowie die naszente DNA. Naszente DNA kann durch Einbau von Basenanaloga, wie dem Thymidinanalog 5'-Bromo-2'-Desoxyuridin (BrdU) und anschließender Immunfärbung mit einem geeigneten Antikörper in fixierten Zellen dargestellt werden (Gratzner, 1982; Nakamura et al., 1986; Nakayasu und Berezney, 1989). Bei Lebendzellbeobachtungen ist der Nachweis naszenter DNA nach Einbau von fluoreszierenden Nukleotiden möglich (Manders et al., 1999; Zink et al., 1998). Replikationsfoci zeigen während der S-Phase eine definierte räumlich-zeitliche Organisation, dass heißt, sie erscheinen an bestimmten Orten im Zellkern während spezifischer zeitlicher Stadien der S-Phase (Nakamura et al., 1986; Nakayasu und Berezney, 1989; O'Keefe et al., 1992). Während der frühen S-Phase besetzen die

Replikationsfoci das Kerninnere mit Ausnahme der Nukleoli. Zu späteren Zeitpunkten sind die Replikationsfoci an den nukleären und nukleolären Peripherien konzentriert. Während der späten S-Phase sind wenige sehr große Replikationsfoci an der Kernperipherie und im Kerninneren lokalisiert. Bisher ist weitgehend ungeklärt, wie die räumlich-zeitliche Organisation der DNA-Replikation während der S-Phase koordiniert wird. Unklar ist auch, wie der Replikationszeitpunkt von einzelnen Replikons und Replikon-Clustern determiniert wird. Verschiedene Studien legen einen engen Zusammenhang zwischen der Positionierung von Chromatin-Domänen im Zellkern und ihrem Replikationszeitpunkt nahe (Dimitrova und Gilbert, 1999; Gilbert, 2001; Heun et al., 2001a). Des weiteren ist auch nicht klar, welchen dynamischen Umlagerungen die DNA während der DNA-Replikation unterliegt. Untersuchungen von DNA-Doppelpulsmarkierungen in fixierten Zellen zeigten, dass sich bereits replizierte und gerade zum Zeitpunkt der Fixierung replizierende DNA-Domänen voneinander mit einer Geschwindigkeit von circa 0,5 $\mu\text{m}/\text{h}$ trennten (Manders et al., 1996). Das bedeutet, dass die DNA immobil sein könnte, während sich die Replikationsmaschinerie von Orten vorangegangener DNA-Synthese mit dieser Geschwindigkeit wegbewegen könnte. Alternativ könnte sich auch die neu synthetisierte DNA von Orten der Replikationsaktivität wegbewegen (Manders et al., 1992; Manders et al., 1996). Entsprechend legten elektronenmikroskopische Untersuchungen von Kernmatrixpräparationen nahe, dass Komplexe aus Replikationsproteinen, die aktiv naszente DNA synthetisieren, an die nukleäre Matrix gebunden sind (Berezney and Coffey, 1975; Jackson et al., 1990; Nelson et al., 1986; Pardoll et al., 1980; Hozak et al., 1993). Pulse-Chase Experimente legten weiterhin nahe, dass DNA aus solchen Matrix-gebundenen Komplexen herausgespult wird (Hozak et al., 1993). Diese Daten stützen die Vorstellung, dass DNA dynamisch durch an der Matrix immobilisierte DNA-synthetisierende Komplexe hindurchgespult wird. In diesem Zusammenhang wurde der Ausdruck „Replikationsfabrik“ geprägt (Hozak et al., 1993), der die Größe und Immobilität der Matrix-gebundenen Proteinkomplexe an den Replikationsfoci unterstreichen soll.

Untersuchungen zur Dynamik von GFP-PCNA Fusionsproteinen in lebenden Zellen zeigten, dass Replikationsfoci eine heterogene Größe besitzen und eine unterschiedliche Lebensdauer haben (Leonhardt et al., 2000a). Die Daten legten ferner nahe, dass aktive Komplexe aus Replikationsproteinen nicht durch den Kern wandern. Vielmehr legten die Daten nahe, dass die Komplexe asynchron an unterschiedlichen Orten in die einzelnen Proteine zerfielen, beziehungsweise aus den einzelnen Komponenten neu gebildet wurden (Leonhardt et al., 2000a), wodurch letztendlich die Änderungen der Muster während des Voranschreitens der S-Phase zustande kommen. Die Ergebnisse jüngster FRAP-Experimente unterstützen die Vorstellung, dass die makromolekularen Komplexe aus Replikationsproteinen zu bestimmten Zeiten an bestimmten Orten im Zellkern erschienen, indem sie asynchron zerfallen beziehungsweise sich aus den einzelnen Proteinen neu bilden (Sporbert et al., 2002). Dabei zeigte sich auch, dass neue Komplexe sich bevorzugt an Orten bildeten, die eng benachbart waren zu Orten vorangegangener DNA-Synthese (Sporbert et al., 2002). Diese Befunde könnten so interpretiert werden, dass Orte aktiver DNA-Synthese benachbarte Orte aktivieren, zum Beispiel durch lokale Änderungen der Chromatinstruktur. Damit würde die Replikation „automatisch“ von einem benachbarten Ort zum nächsten weiterlaufen. Dieser hypothetische Vorgang wird auch als „Domino-Effekt“ bezeichnet (Sporbert et al., 2002). Noch ist jedoch weitgehend unklar, auf welche Weise die Aktivierung benachbarter Orte erfolgen könnte. Insgesamt besteht weiter Aufklärungsbedarf bezüglich des dynamischen Zusammenspiels von DNA und aktiven Proteinkomplexen während

der DNA-Synthese und bezüglich der Frage, wie der zeitlich-räumliche Verlauf der DNA-Replikation im Kern von Säugern koordiniert wird.

1.5 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit sollten verschiedene Aspekte der dynamischen Organisation des Säugetierzellkerns mit Hilfe der hochauflösenden Laserscanning Mikroskopie untersucht werden. Besonderes Gewicht sollte auf die Analyse lebender Zellen gelegt werden.

Im ersten Teil der Arbeit sollte die Topologie der RNA-Synthese im Zellkern untersucht werden. Besonders sollte hierbei analysiert werden, ob naszente RNA vorwiegend in chromatinarmen Bereichen des Zellkerns zu finden ist, wie es das „Interchromatin-Domänen“-Modell vorhersagt. Die Chromatinstruktur sollte mit Hilfe von HeLa-Zellen dargestellt werden, die stabil eine Fusion zwischen dem „Green Fluorescent Protein“ (GFP) und Histon H2B exprimierten (Kanda et al., 1998; Sadoni et al., 2001). Diese Zellen sollten mit BrUTP markiert werden, welches in naszente RNA eingebaut wird (Jackson et al., 1993; Wansink et al., 1994a). So markierte Zellen sollten mittels konfokaler Laserscanning Mikroskopie untersucht werden.

Daneben sollte die dynamische Interaktion des Spleißfaktor-Kompartiment mit DNA in lebenden CHO-Zellen untersucht werden. Besonders sollte hierbei der Frage nachgegangen werden, ob es eine unterschiedliche Interaktion des Spleißfaktor-Kompartiments mit funktionell unterschiedlichen Chromatinfractionen gibt. Funktionell unterschiedliche Chromatinfractionen sollten mittels Replikations-Pulsmarkierung dargestellt werden (Sadoni et al., 1999), was in lebenden Zellen mit Hilfe von Cy3-dUTP Markierungen geschehen sollte (Zink, 2001). Das Spleißfaktor-Kompartiment sollte in lebenden Zellen mittels eines GFP-Fusionsproteins dargestellt werden, welches speziell in diesem Kompartiment lokalisierte (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von M. C. Cardoso, MDC, Berlin). Zeitserien so markierter Zellen sollten mittels konfokaler Laserscanning Mikroskopie aufgenommen werden. Bezüglich der beobachteten Interaktionen sollte auch untersucht werden, in wieweit diese direkt vom Prozess der Transkription abhängen.

Ein weiterer dynamischer Prozess im Zellkern, der in der vorliegenden Arbeit an lebenden Zellen untersucht werden sollte, war der Prozess der DNA-Replikation. Hierbei sollte besonders untersucht werden, welchen dynamischen Reorganisationen die DNA während der S-Phase unterliegt. Speziell berücksichtigt werden sollte auch die Fragestellung, wie die besondere räumlich-zeitliche Organisation der DNA-Replikation im Zellkern koordiniert wird. Um diesen Fragen nachzugehen, sollte sowohl die replizierte DNA, als auch die Replikationsmaschinerie, gleichzeitig in lebenden HeLa Zellen visualisiert werden. Die DNA sollte hierbei mit Hilfe fluoreszierenden-markierten Nukleotiden dargestellt werden (Zink et al., 1998). Die Replikationsmaschinerie sollte in lebenden Zellen mit Hilfe eines GFP-PCNA Fusionsproteins markiert werden (Leonhardt et al., 2000a). Diese Methodik sollte ermöglichen, zum ersten Mal in lebenden Zellen direkt das Zusammenspiel von replizierender DNA und der Replikationsmaschinerie zu beobachten, und zu analysieren.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Medien

Bezugsquelle

Dulbecco's MEM-Medium, 0,5l

3,7 g/l NaHCO_3
4,5 g/l D-Glucose
1,028 g/l N-Acetyl-L-alanyl-L-glutamine
w/o Na-Pyruvate

Biochrom KG, Berlin

RPMI-Medium 1640; 0,5l

25 mM Hepes
2,0 g/l D-Glucose
5,5 g/l NaCl
2,0 g/l NaHCO_3
5 mg/l Phenolrot
0,532 g/l N-Acetyl-L-alanyl-L-glutamine

Biochrom KG, Berlin

Fötales Kälberserum (FCS)

wurde 10%ig dem Medium zugesetzt

Biochrom KG, Berlin

LB-Medium

10 g/l Tryptone
5 g/l Hefeextrakt
10 g/l Natriumchlorid
pH 7

selbst hergestellt

Penicillin/Streptomycin

(10000 I.E./10000 $\mu\text{g/ml}$):
wurde 1%ig dem Medium zugesetzt

Biochrom KG, Berlin

2.1.2 Puffer, Lösungen, Reagentien

10x PBS (Phosphate Buffered Saline):

80g NaCl
1,69ml 1M HCl
14,4g Na_2HPO_4 H_2O -frei
2,4g KH_2PO_4 (MW136 g/mol)
pH 7,4
ad 1l

1x PBS aus 10x PBS Stammlösung

1:10 mit Aqua dest. verdünnt

1x PBS-Dulbecco w/o Ca^{2+} , Mg^{2+}

Biochrom KG, Berlin

Tris-EDTA-Puffer pH 8,0

Sigma, München

Blockingreagenz:

0,3 % Triton X-100

0,2% Tween-20

3% Bovine Serum Albumin (BSA)

1x PBS

DNase-Puffer (BrdU-Nachweis)

60 mM Tris

0.6 mM MgCl_2

1 mM 2-Mercapto-Ethanol

TSS-Lösung (10 ml):

85 % LB-Medium 8,5 ml

10 % PEG 6000 1 g

5 % DMSO 0,5 ml

50 mM MgCl_2 0,5 ml

pH 6,5

L-Mimosine:

Sigma, München

1g L-Mimosine wurden in 25ml 1M NH_4OH gelöst (200mM Mimosin-Stocklösung), dem Medium wurde Mimosin in einer Endkonzentration von 200 μM zugegeben

Lyse-Puffer zur DNA-Fiber Präparation:

50 mM EDTA

200mM Tris-HCl

0.5% SDS

pH 7,4

Trolox (MW: 250.3 g/mol):

Sigma, München

5g wurden gelöst in 5 ml 1M NaOH, mit circa 5ml 1M HCl neutralisiert, 2M Stocklösung, wurde dem Medium in einer Endkonzentration von 0,1 mM zugegeben

Lipofectamine PLUS Reagent KIT

Life Technologies,
Karlsruhe

Plasmid-Maxi-Prep KIT

Quiagen, Hilden

Transfektionslösungen:

20x HEBS:

8,18 g NaCl
5,95 g HEPES
0,106 g Na_2HPO_4 (MW=142 g/mol)
ad H_2O auf 50 ml
Steril filtrieren, bei
-20°C lagern

2 M CalciumChlorid-Puffer:

2,22 g CaCl_2 (MW=111 g/mol)
161,3 mM Tris pH 7,6
1,61 ml 1M Tris-HCl pH 7,5
0,65 ml 1N NaOH
ad H_2O auf 10 ml
pH auf 7,6 einstellen
Steril filtrieren,
bei -20°C lagern

2x HEBS:

1 ml 20x HEBS
0,1 – 0,15 ml 1N NaOH
ad H_2O auf 10 ml,
pH auf 7,2 einstellen
Steril filtrieren,
bei -20°C lagern

Glycerol shock solution:

5 ml 2x HEBS
1,5 ml Glycerol
3,5 ml H_2O
Steril filtrieren,
bei -20°C lagern

2.1.3 Fixative

3,7% Formaldehyd mit PBS gepuffert:

Merck, Darmstadt

Methanol/Eisessig (3:1)

Merck, Darmstadt

2.1.4 DNA-Farbstoffe

DAPI (4-6-Diamidino-2-phenylindole)
Stocklösung: 2mg/ml DAPI in H_2O ;
eingesetzt wurde 0,5 $\mu\text{g/ml}$ in CMF-PBS
verdünnt

Sigma, München

TOTO-3 Iodide
1mM Stocklösung wurde
1:1000 in PBS verdünnt
eingesetzt

Molecular Probes,
Leiden

2.1.5 Nukleotide

Cy3-AP3-dUTP
1mM Stocklösung; 1:10 für Mikroinjektion
in CMF-PBS verdünnt
(Endkonzentration 100µM)

Amersham Pharmacia
Biotech, Freiburg

Cy5-AP3-dUTP
1mM Stocklösung; 1:10 für Mikroinjektion
in CMF-PBS verdünnt
(Endkonzentration 100µM)

Amersham Pharmacia
Biotech, Freiburg

Fluorescein-12-dUTP
1mM Stocklösung; 1:10 für Mikroinjektion
in CMF-PBS verdünnt
(Endkonzentration 100µM)

Roche Diagnostic,
Mannheim

BrdU (5-Bromo-2'-Desoxyuridin)
200µM Stocklösung; wurde in einer End-
konzentration von 10µM dem
Medium zugesetzt

Sigma, München

CldU (5-Chloro-2'-Deoxyuridine)
200µM Stocklösung; wurde in einer End-
konzentration von 10µM dem
Medium zugesetzt

Sigma, München

IdU (5-Iodo-2'-Desoxyuridine)
200µM Stocklösung; wurde in einer End-
konzentration von 10µM dem
Medium zugesetzt

Sigma, München

5-Bromouridine 5'-Triphosphate
5mg wurden in 100 µl CMF-PBS gelöst,
wurde nicht weiter verdünnt für Mikro-
injektion beziehungsweise Scratch Replication
Labeling (siehe 2.2.10) benutzt

Sigma, München

2.1.6 Antikörper

Primäre Antikörper (monoklonale):

Maus-anti-BrdU-Antikörper,
eingesetzt in einer 1:5 Ver-
dünnung in Blockingreagenz

Becton and Dickinson,
Heidelberg

Maus-anti-SC-35 Antikörper,
eingesetzt in einer 1:3 Ver-
dünnung in Blockingreagenz

Fu and Maniatis, 1990

Ratte-anti-CldU Antikörper,
eingesetzt in einer 1:5 Ver-
dünnung in Blockingreagenz

Harlan Sera Lab,
Hamburg

Sekundäre Antikörper (polyklonale)

Ziege-anti-Maus-Antikörper konjugiert
mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC),
eingesetzt in einer 1:75 Ver-
dünnung in Blockingreagenz

Dianova, Hamburg

Ziege-anti-Maus-Antikörper konjugiert
mit Tetramethyl-Rhodaminisothiocyanat
(TRITC), eingesetzt in einer 1:75 Ver-
dünnung in Blockingreagenz

Dianova, Hamburg

Ziege-anti-Maus-Antikörper konjugiert
mit Indodicarbocyanin (Cy5),
eingesetzt in einer 1:75 Ver-
dünnung in Blockingreagenz

Dianova, Hamburg

Ziege-anti-Ratte-Antikörper konjugiert
mit Cy3, eingesetzt in einer 1:75 Ver-
dünnung in Blockingreagenz

Dianova, Hamburg

2.1.7 Bakterien

Für die Plasmidgewinnung wurde der E. coli Dh5 α Stamm (Φ 80dlacZ Δ M15, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17(rK-, mK+)) verwendet, der freundlicherweise von Prof. W. Gutensohn für die Transformation zur Verfügung gestellt wurde.

2.1.8 Zelllinien

Für die vorliegende Arbeit wurden unterschiedliche Tumorzelllinien verwendet:

- HeLa Subklon 6 Zellen (humanes Cervixkarzinom), die von Prof. Dr. W.W. Franke (DKFZ, Heidelberg) zur Verfügung gestellt wurden ((Scherer, 1953))

- „Chinese Hamster Ovary“ Zellen, Subklon 1 (CHO-K1) ((Puck, 1958))

- HeLa H2B-GFP Zellen. Hierbei handelt es sich um HeLa Zellen, die stabil ein Fusionsprotein zwischen dem humanen Histon H2B und einer optimierten Mutante des „Green Fluorescent Protein“ exprimieren (Kanda et al., 1998). Die stabile Zelllinie wurde von Prof. Dr. K. F. Sullivan (Department of Cell Biology, The Scripps Research Institute, La Jolla, California) bereit gestellt.

- SH-EP N14 Zellen (Neuroblastomzellen) sind ein Derivat der SH-EP Zellen ((Ross, 1983)) und stabil mit einem CMV NMYC-Expressionsvektor transfiziert ((Wenzel et al., 1991)).

2.1.9 Zubehör für mikroskopische Präparate

Deckgläser
verschiedene Größen

Marienfeld,
Lauda-Königshofen

Deckgläser
genormter Dicke (0,17 mm)

Assistent,
Sondheim/Rhön

runde Deckgläser (Durchmesser: 40 mm)
genormter Dicke (0,17 mm)

Bioptechs,
Butler, USA

runde Deckgläser (Durchmesser: 14 mm und 15 mm)

Schubert und Weiss,
München

Einbettmittel
Vectashield

Linaris,
Wertheim-Bettingen

Immersionsöl
518 N

Carl Zeiss Jena GmbH,
München

Nagellack
Farblos

Manhattan,
Stuttgart

Vakuumfett
„Glisseal“

Borer Chemie,
Basel

2.1.10 Lebendzellkammer und Mikroskopie

Lebendzellkammer (beheizbar):
FCS2 (siehe Abbildung 3)

Bioptechs,
Butler, USA

Inversmikroskop

Axiovert 135 TV

Carl Zeiss Jena GmbH,
GöttingenAusgestattet mit:Lampenhelligkeitsregler
AttoArcCarl Zeiss Jena GmbH,
Göttingen

100 W Quecksilberdampf-Lampe

Osram,
MünchenShutter
Uniblitz D122Vincent Associates,
Rochester, USA

Filtersätze:

1. Anregungsfilter: BP 546/12; Farbteiler: FT 560; Sperrfilter: BP 575-640
2. Anregungsfilter: G 365; Farbteiler: FT 395; Sperrfilter: LP 420
3. Anregungsfilter: BP 450-490; Farbteiler: FT 510; Sperrfilter: BP 515-565

CCD- Kamera:
MicroMAX
Hochauflösende slow-scan CCD-Kamera
Pixelgröße 6,8 µm x 6,8 µmPrinceton Instruments,
Monmouth Junction,
USASoftware für Bildaufnahmen
Metamorph 4.0/4.5Visitron,
München**Konfokales Laserscanningmikroskop**

TCS 4D

Leica,
Bensheim

Zum Scannen verwendetes Objektiv

Plan Apo 63x/1,34 (Öl)

Laser

Argon-Krypton-Laser
mit den Wellenlängen
488nm, 568nm und
647nm

Software

TCS

Konfokales LaserscanningmikroskopLSM 410 mit
Inversmikroskop AxiovertCarl Zeiss Jena GmbH,
Göttingen

Zum Scannen verwendetes Objektiv

Plan Apo 63x/1,4 (Öl)

Laser

Argon-Ionen-Laser
mit der Wellenlänge
488 nm

	Helium-Neon-Laser mit der Wellenlänge 543 nm
	Helium-Neon-Laser mit der Wellenlänge 633 nm
Filtersätze:	
Beamsplitter:	FT 488/543
Emissionsfilter:	BP 502-542 nm BP 575-640 nm RG 665
<i>Konfokales Laserscanningmikroskop</i>	
LSM510 mit Inversmikroskop Axiovert	Carl Zeiss Jena GmbH, Göttingen
Zum Scannen verwendetes Objektiv	Plan Apo 63x/1,4 (Öl)
Laser	Argon-Ionen-Laser mit der Wellenlänge 488 nm
	Helium-Neon-Laser mit der Wellenlänge 543 nm
Filtersätze:	
Beamsplitter:	HFT 488; NFT 490; HFT UV/488; HFT UV/488/543/633; NFT 635 VIS; NFT 545; NFT 490;
Emissionsfilter:	BP 505-550; LP 505; BP 385-470; BP 505-530; BP 585-615; LP 560
2.1.11 Mikroinjektionsanlage und Zubehör	
Mikroinjektionsanlage	Cellbiology Trading, Dr. Rudolf Kern, Hamburg
AIS 2 (automated injection system)	Luigs & Neumann, Ratingen

Transjector 5246

Eppendorf,
Hamburg

Fluoreszenzmikroskop
Axiovert S100

Carl Zeiss Jena GmbH,
Göttingen

Software

CompiC Inject

Kapillaren-Puller
Model P-97
Mikroinjektionsnadeln
borosilicate glass capillaries
1,2mm O.D x 0,94mm I.D.
thin wall - with inner filament

Sutter Instruments Co.,
Novato, USA
Clark electromedical
instruments

2.1.12 Software

Photoshop 6

Adobe,
Unterschleißheim

Premiere 6

Adobe,
Unterschleißheim

Metamorph 4.0 / 4.5

Visitron,
München

ImageJ 1.29

Public Domain,
<http://rsb.info.nih.gov/ij/>

Amira 2.3

TGS,
Paris

Office 2000

Microsoft,
München

2.2 Methoden

2.2.1 Herstellung kompetenter Zellen

Es wurde eine über Nacht (ÜN) Kultur von *E. coli* Dh5 α angesetzt. Dazu wurden 5 ml LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C und 200 rpm geschüttelt. 500 μ l der ÜN-Kultur wurden in 50 ml LB-Medium verdünnt. Danach wurde die Kultur bei 37°C und 200 rpm bis zu einer optischen Dichte von 0,5 bis 0,6 bei 600 nm weiter inkubiert. Anschließend wurde die Kultur dann für 30 min auf Eis gestellt und dann für 10 min bei 3000 rpm, 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 5 ml TSS-Lösung resuspendiert und bei -20°C weggefroren.

2.2.2 Transformation von Escherichia coli

Für die Transformation wurden 100 ng Plasmid-DNA in 200 μ l kompetente *E. coli* Dh5 α aufgenommen und für 30 min auf Eis aufbewahrt. Die Zellen wurden darauf einem Hitzeschock bei 42 °C für 1 min ausgesetzt und dann sofort für 2 min auf Eis gekühlt. Die Zellen wurden nun in 800 μ l LB-Medium aufgenommen, und wurden für 30-45 min bei 37 °C bei 200 rpm geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen komplett auf LB-Platten mit Kanamycin (75 μ g/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Platten wurden bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt.

2.2.3 Plasmidpräparation zur Gewinnung größerer Mengen an Plasmid-DNA

Die Plasmidpräparation (siehe Abbildung 2) wurde mit einem Plasmid-Maxi-Prep KIT (Quiagen) durchgeführt. 5 ml LB Medium mit 100 μ g/ml Kanamycin wurden mit einer einzelnen Kolonie einer frisch ausplattierten, Kanamycin-resistenten Kultur (siehe 2.2.2) angeimpft. Diese Starterkultur wurde für circa 8h bei 37°C im Schüttler (200rpm) inkubiert. Anschließend wurde die Kultur 1:500 in selektivem LB Medium (100 μ g/ml Kanamycin) verdünnt. Für high-copy Plasmide wurden 100 ml LB Medium verwendet. Anschließend wuchsen die Zellen bei 37°C im Schüttler (200rpm) für 12 bis 16h.

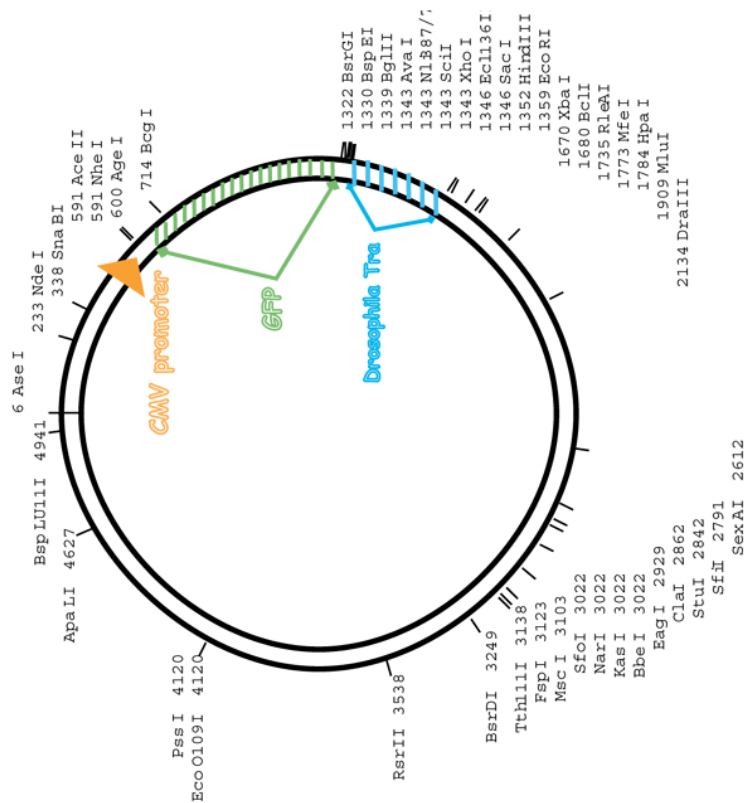
Die Zellen wurden bei circa 6000g für 15 min bei 4°C abzentrifugiert. Dazu wurde der Beckmann JA-14 Rotor verwendet, bei dem 6300 rpm ungefähr 6000g entsprachen. Der Überstand wurde vollständig verworfen, das Pellet wurde in 10 ml Puffer P1 (die Puffer waren im Kit enthalten) resuspendiert und in einen JA-20 Zentrifugenbecher überführt. Nun erfolgte die Zugabe von 10 ml Puffer P2. Vorsichtig wurde durch mehrmaliges Invertieren (4-6 mal) gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der anschließenden Zugabe von 10 ml gekühlten Puffer P3 wurde nochmals vorsichtig durch mehrmaliges Invertieren (4-6 mal) gemischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde bei 20000g und 4°C für 30 min abzentrifugiert (JA-20-Rotor, 12000 rpm). Der Überstand mit dem Plasmid wurde danach sofort abgenommen und nochmals auf gleiche Weise zentrifugiert.

Der Überstand wurde auf eine Quiagensäule 500 aufgetragen, die zuvor mit 10 ml Puffer QBT äquilibriert worden war, bis die Säule nicht mehr tropfte. Die Säule wurde nun mit 2 x 30 ml Puffer QC gewaschen, und die DNA wurde mit 15 ml Puffer QF eluiert. Die DNA wurde mit 10,5 ml Isopropanol (0,7 Volumen, Raumtemperatur) präzipitiert, und dann bei 15000g (JA-20-Rotor, 11000 rpm) für 30 min bei 4°C abzentrifugiert.

peGFPdtra -> Plasmidkarte

MW des Fusionsproteins beträgt 39,4 kD

4999 Basenpaare



pNeGFPcNAL2mut -> Plasmidkarte

MW des Fusionsproteins beträgt 59,5 kD

6030 Basenpaare

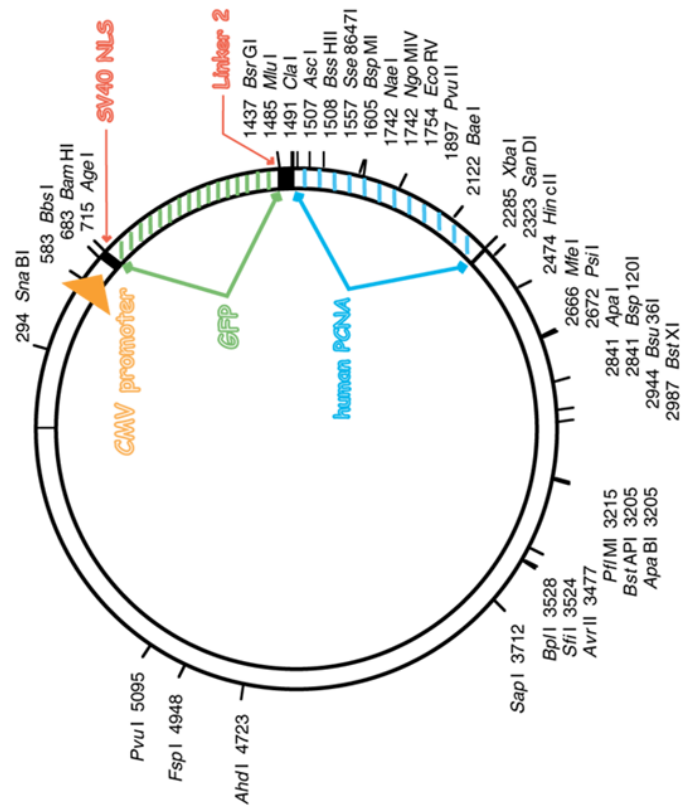


Abbildung 2

Darstellungen der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide. Unten das Plasmid, das zur Darstellung von

Speckles in lebenden Zellen verwendet wurde. Es beinhaltet einen Cytomegalievirus (CMV) Promotor, dem eine für eGFP (e steht für enhanced, also verstärkt) kodierende Sequenz folgt. Diese ist fusioniert mit einer aus *Drosophila melanogaster* gewonnenen Sequenz, die die Speckleslokalisierungssequenz des Spleißfaktors dtra enthält. Oben dargestellt ist das Plasmid, das zur Darstellung von aktiven Replikationsorten in lebenden Zellen benutzt wurde. Es beinhaltet, neben dem CMV Promotor, noch eine Kernlokalisierungssequenz aus dem Simian Virus 40 (SV40), die für eGFP codierende Sequenz, einen Linker2 aus einem Glycin-Leucin Poly-Repeat und die für das menschliche PCNA codierende Sequenz. Beide Plasmide stammen aus dem Labor von H. Leonhardt und C. Cardoso am Max-Delbrück-Centrum (MDC) in Berlin und die gezeigten Plasmidkarten wurden ebenfalls zur Verfügung gestellt. Das für GFP-PCNA kodierende Plasmid ist beschrieben in Leonhardt et al., 2000.

Das DNA-Pellet wurde mit 5 ml 70 % Ethanol (Raumtemperatur) gewaschen, und erneut bei 15000g (JA-20-Rotor, 11000 rpm) für 10 min bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, ohne das Pellet aufzuwirbeln. Das Pellet wurde 5-10 min luftgetrocknet, und die DNA wurde in einem angemessenen Puffervolumen gelöst (TE-Puffer pH 8,0 oder 10 mM Tris-Cl, pH 8,5).

2.2.4 Zellkultur

Die verwendeten Zellen wurden in Nunc Kulturflaschen bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. HeLa-Zellen (HeLa S6 und HeLa H2B-GFP) und Neuroblastomzellen (SH-EP N14) wurden geteilt, wenn sie circa 70 % konfluent waren. Dazu wurde das Medium mit einer Pasteurpipette abgesaugt, und die Zellen wurden mit 10 ml CMF-PBS gewaschen. Nachdem das CMF-PBS entfernt worden war, wurden die Zellen mit 2 bis 3 ml 1:10 verdünnter (in CMF-PBS) Trypsinlösung (0,25 %) abtrypsiniert. Nach dem Ablösen der Zellen wurde die Aktivität des Trypsins durch Zugabe von circa 12 ml frischem RPMI-Medium (mit Zusatz von 10 % FCS und Antibiotika) gestoppt. Von der Zellsuspension wurden 2 ml in eine neue Kulturflasche gegeben, die auf 10, beziehungsweise 20 ml mit frischem RPMI-Medium aufgefüllt wurde. CHO-K1-Zellen wurden bei einer Dichte von circa 90 % Konfluenz wie oben beschrieben geteilt.

Zum Einfrieren wurden Zellen einer Kulturflasche mit circa 70 bis 80 % Konfluenz abtrypsiniert und in eiskaltes RPMI-Medium mit 20 % FCS und 10 % DMSO aufgenommen. Bevor die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert wurden, wurden sie einige Tage bei -80°C gelagert.

Zum Auftauen der Zellen wurde folgendermaßen vorgegangen: Nachdem die Zellen bei 37°C aufgetaut worden waren, wurden sie mit frischem Medium versetzt und bei 200g für 5 Minuten abzentrifugiert. Danach wurden sie in einer Kulturflasche mit Komplettmedium ausgesät.

2.2.5 Synchronisation

Um Zellen in definierten Stadien der S-Phase mit Cy3-dUTP oder BrdU zu markieren, wurden diese synchronisiert. Zur Synchronisation wurden die Zellen mit Mimosin (1 µl 200 mM Mimosinstocklösung/ml Medium) für 16 Stunden inkubiert, und somit zum großen Teil am Beginn der S-Phase arretiert, da Mimosin die Initiation der DNA Replikation hemmt (Kalejta und Hamlin, 1997; Krude, 1999). Um die Arretierung aufzuheben, wurden die Zellen mit CMF-PBS gewaschen und mit frischem Medium versetzt. Die Arretierung wurde nach der Mikroinjektion aufgehoben, wenn früh replizierende DNA

mit Cy3-dUTP markiert werden sollte. Um früh replizierende DNA mit BrdU zu markieren, wurde die Arretierung direkt vor der Pulsmarkierung aufgehoben. Alternativ wurde die Arretierung 4 bis 6 Stunden vor der Replikationsmarkierung aufgehoben, wenn die Zellen während fortgeschrittener Stadien der S-Phase markiert werden sollten.

2.2.6 Transfektion von Säugerzellen

Zur Transfektion wurden Zellkulturen (auf Deckgläser ausplattiert) benutzt, die circa 50 % konfluent waren. Einige Stunden vor der CaPO_4 /DNA-Zugabe wurde das Medium gewechselt. Die DNA-Lösung wurde in einem sterilen 1,5 ml Eppendorf Hütchen vorbereitet. Dafür wurden pro Ansatz 31 μl 2M CaCl_2 -Puffer, 10 – 30 μg DNA und H_2O (ad auf 0,5 ml) gemischt. Pro Transfektion wurden 0,5 ml 2x HEBS in einem 15 ml Falconröhrchen vorgelegt. Die DNA-Lösung wurde unter leichtem Vortexen langsam dazu getropft. Die Lösung sollte hierbei leicht milchig werden und dann 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen bleiben. Die DNA/HEBS-Lösung wurde unter der Sterilbank einmal auf- und abpipettiert, damit Präzipitate zerkleinert wurden, und dann tropfenweise auf die Zellen gegeben. Die Inkubationszeit betrug 6 Stunden bis über Nacht. Es sollte ein feines Präzipitat („Salz und Pfeffer“) in der Kultur zu sehen sein.

Für die weitere Prozedur sollten die Glycerol Schock Lösung, PBS und das Medium auf 37°C vorgewärmt werden. Von den Zellen wurde das Medium mit dem Präzipitat abgenommen. Anschließend wurden die Zellen gründlich mit PBS gewaschen. Pro Deckglas wurde 1 ml Glycerol-Schock-Lösung zugegeben. Diese wirkte für circa 2 Minuten ein. Zum Verdünnen der Glycerol-Schock-Lösung wurden 10 ml Medium zugegeben und gründlich abgesaugt. Zum Schluss wurde das gewünschte Medium zugegeben, und die Zellen wurden zurück in den Brutschrank gestellt.

Alternativ wurden Transfektionen mit dem Lipofectamine Plus Reagent der Firma Life Technologies durchgeführt. Hierbei wurde exakt nach dem Herstellerprotokoll verfahren.

2.2.7 BrdU-Markierung

Während bestimmter Stadien der S-Phase kann synthetisierte DNA durch Pulsmarkierung mit Basenanaloga, gegen die spezifische Antikörper verfügbar sind, nachgewiesen werden. (Aten et al., 1992; Nakamura et al., 1986; Nakayasu und Berezney, 1989; O’Keefe et al., 1992). Bei den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimenten wurde das Thymidinanalog Bromodesoxyuridin (BrdU) für 30 min in einer Endkonzentration von 10 μM dem Medium zugegeben. Nach der Pulsmarkierung wurden, je nach weiterer Vorgehensweise, die Zellen entweder sofort fixiert, oder mit CMF-PBS gewaschen und mit frischem Medium versetzt (Zink et al., 1998).

2.2.8 Markierung naszenter RNA mit BrUTP

Um die Topologie der RNA-Synthese im Zellkern zu untersuchen, wurde naszente RNA mit BrUTP-Puls markiert (Wansink et al., 1993). Hierfür wurden HeLa H2B-GFP Zellen auf Deckgläsern ausplattiert. Auf die 10 bis 15 minütige BrUTP-Mikroinjektion (0,1 M BrUTP) erfolgte die sofortige Fixierung mit 3,7 % Formaldehyd in PBS (10 Minuten bei

Raumtemperatur). Alternativ wurden die Zellen mittels Scratch Labeling (siehe 2.2.10) mit BrUTP markiert und nach ebenfalls 10 min mit 3,7 % Formaldehyd fixiert.

2.2.9 Mikroinjektion

Für die Mikroinjektion wurde ein Tropfen (5 beziehungsweise 10 µl) einer abtrypsinierten, gut gemischten Zellsuspension auf die Mitte eines sauberen, sterilen Deckglases gegeben, das in eine Petrischale gelegt wurde. Der Raum zwischen Deckglas und Wand der Petrischale wurde mit Medium so weit gefüllt, dass das Deckglas mit dem Tropfen Zellsuspension nicht mit Medium überspült wurde. Nach circa 30 Minuten (CHO-Zellen) beziehungsweise 1 Stunde (Hela-Zellen) hatten sich die Zellen auf dem Deckglas festgesetzt, und es wurde 5 ml frisches Medium hinzugegeben. Auf diese Weise konnten Zellen in einem relativ kleinen Areal in der Mitte des Deckglases leicht während der Lebendzellmikroskopie wiedergefunden werden.

Eine andere Methode, um Zellen leicht wiederzufinden, war das Einritzen einer Markierung mit einem Wolframstift in das Deckglas. Der Vorteil hierbei war, dass die Zellen auf dem ganzen Deckglas ausplattiert werden konnten. Sobald die Zellen anfangen, sich auf dem Substrat auszubreiten, saßen sie fest genug, um mikroinjiziert zu werden. Meist wurden sie jedoch am folgenden Tag mikroinjiziert.

Die Glaskapillaren wurden kurz vor der Mikroinjektion am Puller mit dem voreingestellten Programm Nummer 1 beziehungsweise 2 gezogen.

Für die Mikroinjektion wurden die Nukleotidlösungen, beziehungsweise Plasmidlösungen (Cy3-dUTP, FITC-dUTP, Cy5-dUTP und BrUTP je 100 µM; Plasmid 5 ng/µl) 30 min bei 13000 rpm abzentrifugiert, um Partikel aus der Lösung zu entfernen, die die Kapillare verstopfen könnten.

Die Petrischale mit dem Deckglas, auf dessen Oberseite die Zellen wuchsen, wurde so in den Tisch des Mikroskops eingesetzt, dass das Deckglas möglichst mittig im Strahlengang des Objektivs lag. Nachdem die Zellen mit dem 5x Objektiv fokussiert worden waren, wurde mit einer Pipettierhilfe mittels Mikroloaderspitzen circa 1 µl der Nukleotid- beziehungsweise Plasmidlösung in die Glaskapillare gegeben. Die Kapillare wurde in den Mikromanipulator eingespannt, und das Softwareprogramm CompiC Inject wurde aufgerufen. Im Setupmodus wurde die Kapillare in die richtige Position gebracht und mit dem 32x Objektiv wurde eine Kalibrierung der Nadel durchgeführt. Von jetzt an konnte man die Zellkerne mikroinjizieren. Dazu klickte man mit dem Mauscursor die gewünschte Stelle an, in die die Nadel einstechen sollte. Eventuell musste man die vertikale Lage der Nadelspitze nachjustieren. Die Mikroinjektion fand direkt in die Kerne der Zellen statt. Nach der Mikroinjektion wurde das Medium gewechselt. Die mikroinjizierten Zellen wurden für eine weitere Nacht inkubiert, und am nächsten Morgen auf dem Deckglas in die Lebendzellkammer gespannt, beziehungsweise für eine weitere Injektion verwendet.

2.2.10 Scratch Replication Labeling (SRL)

Um Zellen schnell und einfach mit fluoreszierenden Nukleotiden, oder BrUTP zu markieren, wurde das Scratch Replication Labeling (SRL) Protokoll (Schermerle et al., 2001) angewandt. Hierbei wurde die Rückseite von einem Deckglas, auf dessen Oberseite Zellen wuchsen, mit einem Kleenextuch ein paar Sekunden angetrocknet.

Das Deckglas wurde darauf in eine neue Petrischale überführt und mit einer 1:50 mit konditioniertem Medium verdünnten Nukleotidlösung (20µM FITC-dUTP, Cy3-dUTP oder Cy5-dUTP), oder einer 1:10 verdünnten BrUTP-Lösung (10 mM) überdeckt. Mit einer herkömmlichen Einmal-Injektionskanüle (Größe 14) wurde nun über die Zellen gekratzt. Anschließend wurde die Petrischale für 5 Minuten zurück in den Brutschrank gestellt. Schließlich wurden die Zellen dreimal mit PBS-CMF gewaschen, und konditioniertes Medium wurde hinzugegeben. Die Zellen wurden dann nach unterschiedlichen Zeitintervallen für Lebendzellbeobachtungen verwendet, oder fixiert und eingebettet.

2.2.11 Fixierungen und Einbettung

Für die Mikroinjektion, oder die Mikroskopie wurden die Zellen auf Deckgläser ausplattiert. Die Zellen wurden auf den Deckgläsern mit 3,7 % Formaldehyd in PBS für 10 min bei Raumtemperatur fixiert. Vor der Fixativzugabe wurde das Medium abgesaugt, und die Präparate wurden 3 mal mit PBS gewaschen. Nach Fixierungsende wurden die Zellen erneut dreimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann für Immunfärbungen weiter verwendet. Wenn die Zellen schon sichtbar markiert worden waren (zum Beispiel Replikationsmarkierung durch Mikroinjektion), konnten sie auch direkt für die Mikroskopie eingedeckelt werden. In dem Fall wurden sie mit DAPI (Material, siehe oben) für 5 bis 10 Minuten im Dunkeln gefärbt. Nach Abnahme der Färbelösung wurden die Deckgläser erneut dreimal mit PBS gewaschen, um überschüssige Farbstoffmoleküle zu entfernen.

Zum Eindeckeln wurde überschüssiger Puffer abgesaugt, jedoch wurde darauf geachtet, dass die Präparate immer feucht blieben. Zwischenzeitlich wurde Vectashield-Lösung (5 bis 20 µl, von der Größe des Deckglases abhängig) auf einen Objektträger pipettiert, und das noch feuchte Präparat vorsichtig damit eingedeckelt. Schließlich wurde das Deckglas mit Nagellack versiegelt, und sobald dieser getrocknet war, wurde das Präparat in einer Präparatenmappe gegeben bei 4°C aufbewahrt.

2.2.12 Immunfärbungen

Die in die DNA, oder in die naszente RNA eingebauten Nukleotidanaloga BrdU und BrUTP, sowie unterschiedliche Kernproteine, wurden durch Immunfärbungen folgendermaßen nachgewiesen: Die Präparate wurden mit Formaldehyd fixiert, und anschließend mit PBS gewaschen. Für den BrdU-Nachweis wurde die DNA nach der Fixierung mit 2N HCl für 30 min denaturiert. Anschließend wurden die Präparate durch Waschen mit PBS neutralisiert und für 30 min bei Raumtemperatur mit Blockingreagenz (0,3 % Triton X; 0,2 % Tween; 3 % BSA in PBS) inkubiert. Danach wurde mit dem entsprechenden primären Antikörper (siehe 2.1.6) für 1 Stunde in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach 3x5 min Waschen mit 0,2 % Triton/PBS wurde mit dem sekundären Antikörper (siehe 2.1.6) ebenfalls für 1 Stunde in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich wurde mit PBS 3x5 min auf einem Schüttler im Dunkeln gewaschen, und zum Abschluss noch mit DAPI (0,5 µg/ml in PBS) gefärbt. Die Präparate wurden kurz mit PBS gespült, und mit Vectashield eingedeckelt.

2.2.13 BrdU-Nachweis mit Hilfe von DNase

Um in die DNA eingebautes BrdU mit Hilfe von Antikörpern nachweisen zu können, muss die DNA einzelsträngig vorliegen. Um einzelsträngige DNA zu erhalten, kann diese denaturiert werden. Die Denaturierung kann zum Beispiel über Inkubation mit 2N HCl erfolgen (siehe oben). Denaturierung der DNA mit Agenzien wie HCl kann jedoch zu Änderungen in der Chromatinstruktur führen. Um solche Artefakte zu vermeiden, kann die DNA mittels DNase einzelsträngig gemacht werden. Hierfür wurde folgendermaßen verfahren:

Das Präparat wurde für 10 min in Blockierungslösung (0,3 % Triton X; 0,2 % Tween; 3 % BSA in PBS) inkubiert und dann für 30 min bei 37°C mit Antikörperlösung in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Antikörperlösung enthielt pro 100 µl: 50 µl Denaturierungspuffer (siehe 2.1.2), 1 µl Dnase I, 5 µl Maus anti-BrdU-Antikörper und 45 µl Blockierungslösung. Anschließend wurde 3 mal für 3 min mit PBS/Triton gewaschen und dann mindestens für 1 h bei 37°C mit einem sekundären Antikörper (1:100-200 in Blockierungslösung) inkubiert. Es wurde wieder 3 mal für 3 min mit PBS/ Triton gewaschen und dann mit DAPI (0,5 µg/ml) für 3 Minuten gefärbt. Mit Hilfe eines Antifading-Mittels (Vectashield) wurde das Präparat eingebettet, und die Ränder des Deckglases wurden mit Nagellack versiegelt.

2.2.14 Lebendzellmikroskopie

Ein relativ einfach zu handhabendes Kammersystem für die Lebendzellmikroskopie wurde im Labor von Dr. Ernst Stelzer (EMBL) entwickelt. Die rechteckige Kammer besteht aus Aluminium, und besitzt in der Mitte ein gestuftes Loch mit einem Durchmesser von circa 15 mm. Mit silikonfreiem Vakuumfett wurden beide Öffnungen der Kammer mit Hilfe eines sterilisierten Holzzahnstochers leicht eingefettet. Zuerst wurde ein Deckglas ohne Zellen auf der einen Seite der Kammer mit Hilfe des Fettes befestigt, und 1 ml konditioniertes Medium wurde in die Öffnung auf das Deckglas gegeben. Schließlich wurde die Kammer mit dem Deckglas mit den Zellen versiegelt. Da die Kammer aus Aluminium bestand, konnte sie über das Objektiv mit Hilfe einer Objektivheizung gut beheizt werden. Der Vorteil an dieser Kammer ist die einfache Handhabung, und dass fast alle Zellen auf dem Deckglas zur Lebendzellbeobachtung verwendet werden können. Der Nachteil an dieser Kammer ist, dass die Zellen nicht so lange vital bleiben, und dass sie nicht so einfach perfundierbar ist.

Für Langzeitbeobachtungen in der Lebendzellmikroskopie wurde ausschließlich die kompliziertere FCS2 Kammer der Firma Biophtechs verwendet. Das Medium konnte hier einfach durch Perfusion (Pfeilspitzen Abbildung 3 a) ausgetauscht werden und die Zellen blieben länger vital. Außerdem konnte die Kammer über einen Controller (5 in Abbildung 3 a) und ein beschichtetes Deckglas (2 in Abbildung 3 a) gleichmäßig beheizt werden, so dass innerhalb der Kammer keine starken Temperaturschwankungen auftraten (zum Beispiel an der Kontaktstelle zum Objektiv). Das Vermeiden von Temperaturschwankungen ist wichtig, da sie besonders an der Kontaktstelle zum Objektiv zu einem veränderten Verhalten der beobachteten Zellen führen können.

Die Kammer besteht aus einem wärmeleitenden Metalldeckel (siehe Abbildung 3 a für die unterschiedlichen Komponenten), in welchen, abgedichtet durch einen Dichtungsring, das Deckglas mit den Zellen eingelegt wird. In diesem Deckel befindet sich ein drehbarer Metallring mit Haken. Mit Hilfe der drehbaren Haken wird die Kunststoffunter-

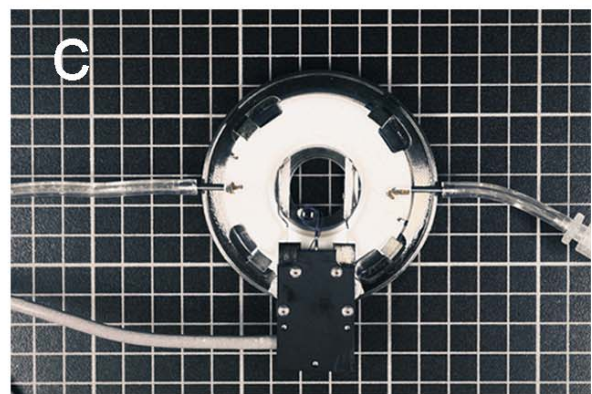
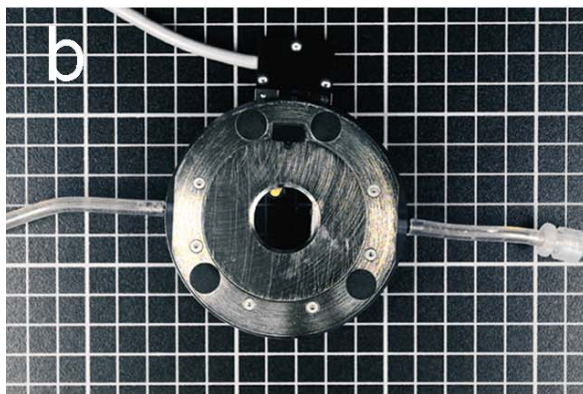
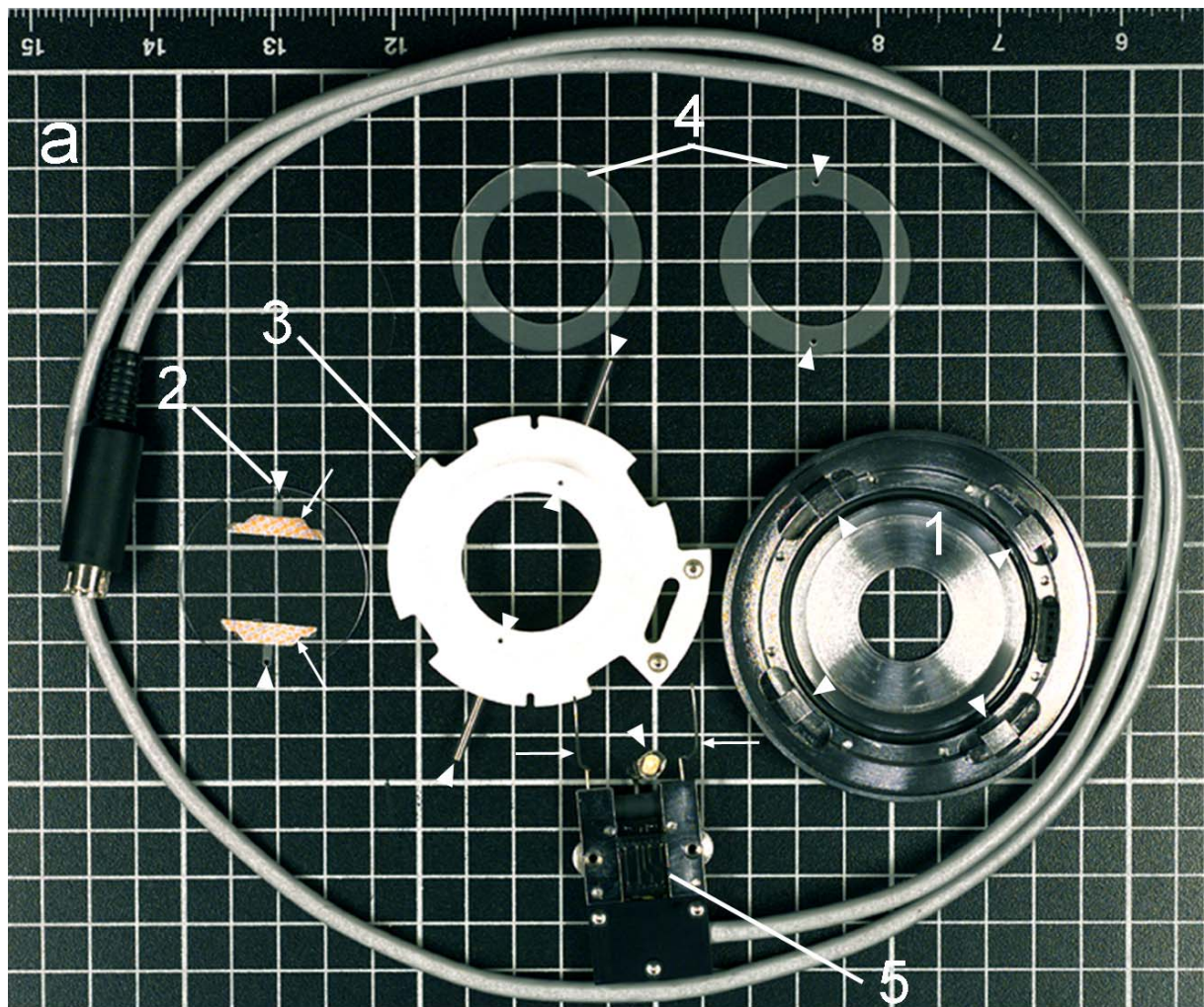


Abbildung 3

a) Abgebildet sind die Bestandteile der Lebendzellkammer FCS2 (Bioprotech Inc., Butler, USA):

(1) Metalldeckel mit Haken (Pfeilspitzen) zur Befestigung der Unterseite, (2) platinbeschichteter Objektträger mit Öffnungen für die Perfusionsstutzen (Pfeilspitzen) und Kontakten (Pfeile) für die Heizung, (3) Kunststoffaufsatz mit Perfusionsöffnungen (Pfeilspitzen), (4) Dichtungsringe mit Öffnungen für Perfusionsstutzen (Pfeilspitzen) und (5) Heizung mit Kontakten (Pfeile), Temperaturfühler (Pfeilspitzen) und Kabel zur Kontrolleinheit.

b) Ansicht der Kammer von oben. Im Zentrum befindet sich das mit Zellen bewachsene Deckglas, auf welches das Objektiv aufgesetzt wird.

c) Ansicht der Kammerunterseite. Hier befindet sich die Heizung und das beheizbare Deckglas. In b und c sind Schläuche an die Perfusionsstutzen angeschlossen.

seite der Kammer gegen die Oberseite gedrückt, so dass die Kammer fest verschlossen wird. In der Unterseite, welche die Öffnungen für die Perfusion besitzt, wird das platinbeschichtete Deckglas so eingelegt, dass die Beschichtung und die Kontaktstellen für die Heizung außen liegen. Über die Kontaktstellen und die Beschichtung wird mit Hilfe der Heizung Wärme über das Deckglas geleitet, welche dieses gleichmäßig beheizt. Die Wärme wird mit Hilfe eines Temperaturfühlers in der Heizung geregelt. Die Heizung wird an eine entsprechende Kontrolleinheit angeschlossen (nicht gezeigt). In das beschichtete Deckglas eingraviert sind Öffnungen für die Perfusionsstutzen und Kanäle zur Leitung des Mediums. Der Dichtungsring mit den Öffnungen für die Perfusionsstutzen wird auf die unbeschichtete Seite des Deckglases aufgelegt. Der Dichtungsring bestimmt den Abstand zwischen dem mit Zellen bewachsenen Deckglas und dem beheizten Deckglas, und ist in verschiedenen Dicken (0,1-1 mm) erhältlich. An die äußeren Perfusionsstutzen der Kammer können entsprechende Schläuche angeschlossen werden (Abbildung 3 b und c). Wird die Kammer ohne Perfusion betrieben, müssen die Öffnungen abgedichtet werden. Der Zusammenbau wurde immer unter sterilen Bedingungen in der Sterilbank durchgeführt. Vor Gebrauch wurde die Kammer mit 80 % Ethanol desinfiziert. Vor dem Zusammenbau war es wichtig, dass eventuelle Alkoholrückstände von den Gummierungen, beziehungsweise dem Objektträger entfernt wurden. Dazu wurden sie erst in einer mit PBS gefüllten Petrischale gewaschen, und dann für einige Minuten in eine mit RPMI Medium (mit 10 % FCS und Antibiotika) gefüllte Petrischale überführt.

So kurz wie möglich vor dem Zusammenbau der Kammer wurden die Zellen aus dem Inkubator geholt, die auf einem in die Kammer passenden Deckglas wuchsen. Das Medium war mit 0,1 mM Trolox versetzt worden, um phototoxische Effekte während der Mikroskopie zu minimieren. Die Kammer wurde so schnell wie möglich zusammengebaut, um Änderungen im pH-Wert des Mediums durch Kontakt mit der normalen Atmosphäre zu verhindern. Die Kammer wurde mit dem Medium, in welchem die Zellen gewachsen waren, befüllt, um das Milieu so wenig wie möglich zu verändern. Stress der Zellen während des Zusammenbaus der Kammer (mechanischer Stress, Änderung des pH-Werts) führen sehr schnell zu Zellzyklusarrest und Zelltod, so dass die Zellen unbrauchbar werden. Die Lebendzellkammer wurde nun in einer vorgeheizten Styroporbox mit Wärmeelementen zum Mikroskop (Abbildung 4) transportiert, und dort dann an den FCS 2 Controller angeschlossen und konstant bei 37°C gehalten.

2.2.15 Aufnahmen am Epifluoreszenzmikroskop

Hier wurden mit Hilfe einer CCD-Kamera (MicroMAX), angesteuert durch die Software Metamorph, zweidimensionale Aufnahmen der fixierten Präparate, sowie Lebendzellaufnahmen mit Hilfe der Lebendzellkammer FCS2 angefertigt. Dafür wurden die 40x (NA 1,3) und 63x (NA 1,4) Objektive verwendet (Filtersätze siehe 2.1.11). Die Belichtungszeiten für Lebendzellaufnahmen (zwischen 50 ms und 250 ms) wurden so kurz wie möglich bei einer so gering wie möglich gehaltenen Lichtintensität gewählt, um keine strahlungsbedingten Schäden zu induzieren. Dazu wurde meist die Licht-Intensität auf 30 % eingestellt (AttoArc) und die Lichtzufuhr durch einen Graufilter reduziert (bis zu 5 %). Die Dauer der Lebendzellaufnahmen variierte von ein paar Stunden bis zu einem Tag, wobei dabei mit unterschiedlichen Frequenzen aufgenommen wurde (Minuten bis Stunden).



Abbildung 4

a) Abgebildet ist die gesamte Zeiss LSM 410 Einheit:

(1) Kontrollmonitor für Scanparameter, (2) Kontrollmonitor für die Aufnahme der Zelle, (3) Kontrollmonitor für den motorisierten Tisch, (4) LSM 410 Laser und Filter Einheit und (5) Inversmikroskop.

b) (6) Heizungskontrolle der Lebendzellkammer.

c) (7) auf dem Mikroskoptisch befestigte Lebendzellkammer.

2.2.16 Aufnahmen am konfokalen Laserscanningmikroskop

- Leica TCS 4D:

Für die Aufnahmen an diesem konfokalen Laserscanningmikroskop wurden Standardeinstellungen verwendet (Eils et al., 1996). Die Pixelgröße betrug 100 nm x 100 nm und der z-Abstand zwischen den einzelnen lichtoptischen Schnitten betrug 250

nm. Die Laserpower und die Signalverstärkung wurden so gewählt, dass es im Kern möglichst keine überbelichteten Bereiche gab. Die einzelnen lichtoptischen Schnitte wurden 8 beziehungsweise 16 mal gemittelt.

- Zeiss LSM 410 und Zeiss LSM 510:

Für die Aufnahmen an diesen konfokalen Laserscanningmikroskopen wurden etwas variablere Einstellungen als am konfokalen Leica Laserscanningmikroskop verwendet. Die Pixelgröße variierte zwischen circa 300 nm x 300 nm und 70 nm x 70 nm. Der z-Abstand der einzelnen lichtoptischen Schnitte betrug bei fixierten Präparaten 250 nm, bei Lebendzellbeobachtungen wurde er meist auf 500 nm eingestellt. Die einzelnen lichtoptischen Schnitte wurden 2 beziehungsweise 4 mal gemittelt. Die Dauer der Lebendzellbeobachtungen richtete sich nach der zu beantwortenden Fragestellung und betrug zwischen 20 min und über Nacht. Die Frequenz der einzelnen Scans variierte zwischen 1,5 min und circa 30 min (abhängig von der Fragestellung).

2.2.17 Bildanalyse

2.2.17.1 Kolokalisationsanalyse von RNA und H2B-GFP markiertem Chromatin

Für die Auswertung der Bilddaten bezüglich der Lokalisierung naszenter RNA (siehe Ergebnisteil 3.1) wurde ein größtenteils automatisches Auswertungssystem mit Hilfe des Programms Metamorph 4.5 entwickelt. Es wurden pro Kern insgesamt fünf lichtoptische Schnitte, die jeweils 1 µm in z-Richtung voneinander entfernt lagen, ausgewertet. Dieser Abstand wurde gewählt, da das Auflösungsvermögen konfokaler Mikroskope in z-Richtung relativ schlecht ist. Durch den gewählten Abstand der ausgewerteten Ebenen in z-Richtung sollte vermieden werden, dass Signale doppelt ausgewertet wurden. Quantitative Daten, wie Intensität und Häufigkeit der Signale definierter Fluorochrome, sowie das Auftreten und die Häufigkeit von kolokalisierenden Signalen bei der Verwendung unterschiedlicher Fluorochrome wurden anschließend mit Hilfe des Programms Metamorph 4.5 erfasst. Um die Auswertung zu erleichtern, waren Makros erstellt worden, die eine weitgehend automatisierte Erfassung der quantitativen Parameter ermöglichten.

Die gemessenen Werte wurden an Excel automatisch weitergegeben. In Excel wurden die weiteren Berechnungen durchgeführt, die es zum Beispiel ermöglichten, tatsächlich gemessene Kolokalisationsdaten mit unter bestimmten Bedingungen erwarteten Werten zu vergleichen (siehe Ergebnisse 3.1.1).

2.2.17.2 Analyse einer „Region of Interest“ (ROI) bezüglich der Intensitäten unterschiedlicher Fluoreszenzsignalen

Für die Analyse der Speckles bezüglich der GFP- und Cy3-Fluoreszenzen (siehe Ergebnisteil 3.2.4) wurde mit dem auf Java basierenden „open source“ Programm ImageJ 1.29 (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) folgendermaßen verfahren: Zuerst wurden die RGB-Bildstapel in zwei getrennte Graustufenbildstapel aufgeteilt, wobei ein Graustufenbildstapel die GFP-Fluoreszenz, der andere Graustufenbildstapel die Cy3-Fluoreszenz beinhaltete. Mit Hilfe des Synchronisation-Plug-in wurden sowohl die Ebenen der beiden Graustufenbildstapel, als auch die Bildkoordinaten des Mauszeigers synchronisiert. Als nächstes wurde ein Schwellenwert so ausgewählt, dass die zu messende

GFP-Fluoreszenz eines Speckles durch die rote Schwellenwertanzeige ausgefüllt wurde. Mit Hilfe des sogenannten „Zauberstabes“ wurde ein markierter Speckle ausgewählt, und die so erstellte Region wurde mit Hilfe des ROI-Manager auf die dazu korrespondierende Ebene des Cy3-Bilderstapel transferiert. Dann wurde mit Hilfe der Histogramm Funktion der mittlere Grauwert beider Fluoreszenzen innerhalb der ROI bestimmt. Dies wurde für jede Ebene durchgeführt, in der das GFP-Signal eines Speckles zu erkennen war, und die Messwerte wurden schließlich in Excel exportiert. In Excel wurden dann die relativen Grauwerte berechnet. Dafür wurden alle gemessenen Grauwerte des GFP-Signals durch den höchsten gemessenen Wert für das GFP-Signal dividiert. Analog wurde mit dem Cy3-Signal verfahren.

2.2.17.3 Visuelle Inspektion der GFP-PCNA-Foci und der fluorochrommarkierten DNA-Foci

Für die visuelle Inspektion der GFP-PCNA-Foci und der markierten DNA-Foci und zur Vorbereitung der quantitativen Messungen wurden ROIs ausgewählt, und entsprechende Projektionen wurden mit der Funktion „stack arithmetic (Sum of)“ in Metamorph 4.5 von allen lichtoptischen Schnitten erstellt, welche ein zu untersuchendes Objekt beinhalteten. Nach der Analyse der Projektionen wurde durch erneute Inspektion der einzelnen konfokalen Ebenen sichergestellt, dass keine anderen Objekte aus darüber, beziehungsweise darunter liegenden lichtoptischen Schnitten erfasst das Ergebnis beeinflussten. Bei der visuellen Inspektion wurde nicht beobachtet, dass Umordnungen bevorzugt in bestimmten Richtungen erfolgten. Deshalb wurden die folgenden quantitativen Analysen in Bezug auf Umordnungen in der x,y-Ebene durchgeführt, da die mikroskopische Auflösung hier am besten ist.

2.2.17.4 Abstandsmessungen zwischen GFP-PCNA-Foci und zwischen GFP-PCNA-Foci und Cy3-markierten Foci

Abstandsmessungen zwischen GFP-PCNA-Foci wurden anhand der erstellten Projektionen in Metamorph 4.5 durchgeführt. Dazu wurden die Intensitätszentren zweier zu vermessender GFP-PCNA-Foci ermittelt und diese Werte in Excel 2000 überführt. In Excel wurde dann automatisch der Abstand zwischen zwei GFP-PCNA-Foci berechnet.

Die Abstandsmessungen zwischen GFP-PCNA-Foci und Cy3-markierten DNA-Foci wurden an einzelnen lichtoptischen Schnitten durchgeführt. Für jeden GFP-markierten Focus wurde der am nächsten liegende mit Cy3-markierte Focus visuell bestimmt. Die Intensitätszentren der benachbarten GFP- und Cy3-markierten Foci wurden mit dem Programm ImageJ 1.29 bestimmt. Dazu wurde ähnlich wie in der Intensitätsanalyse einer ROI mit zwei unterschiedlich fluoreszierenden Signalen (siehe 2.2.17.2) vorgegangen. Der Unterschied war, dass nach Auswahl eines GFP-PCNA Focus mit Hilfe der Funktion „Synchronize x-y coordinates“ des Synchronisation-Plug-Ins sehr leicht der am nächsten liegende Cy3-markierte Focus markiert werden konnte. Die gewonnenen Messdaten wurden dann in Excel überführt, und die Abstände wurden bestimmt.

2.2.17.5 Kolokalisationsanalyse betreffend GFP-PCNA-Foci und Cy3-markierte Foci

Die Kolokalisationsanalysen wurden an einzelnen lichtoptischen Schnitten ausgeführt, wobei alle aufgenommenen Ebenen eines zu evaluierenden Kerns in die Analyse mit einbezogen wurden. Durch das Anlegen eines passenden Schwellenwertes, einerseits für die GFP-PCNA Fluoreszenz, und andererseits für die Cy3 Fluoreszenz, wurden individuelle Objekte (Foci) definiert. Die Anzahl der Objekte (Foci) wurde gezählt, und die gewonnenen Daten wurden in Excel transferiert. Durch das Anlegen eines zweiten Schwellenwertes, der gleichzeitig die beiden Schwellenwerte aus der GFP-PCNA Fluoreszenz und der Cy3 Fluoreszenz beinhaltet, konnten die sich überlagernden Bereiche der Objekte (PCNA- und Cy3-Foci) bestimmt werden. Für die quantitative Auswertung wurden nur kolokalisierende Bereiche gezählt, die aus mindestens 4 benachbarten, aneinandergrenzenden Pixeln (Pixelgröße 100 nm x 100 nm) bestanden. Auch die hier gewonnenen Daten wurden in Excel transferiert. Das Zusammenspiel zwischen Metamorph und Excel war vollständig automatisiert worden, so dass interaktiv nur der zu analysierende Bildstapel in Metamorph eingeladen werden musste, und der passende Schwellenwert für die jeweilige Fluoreszenz eingestellt werden musste.

2.2.18 Erstellung von 3D Rekonstruktionen und Filmsequenzen

Um einen visuellen Eindruck der Daten zu erhalten, wurden mit Hilfe des Programms Amira 2.3 entsprechende 3D-Animationen erstellt. Dieses Programm ermittelt über Polygone ein dreidimensionales Abbild, das in beliebigen Perspektiven von außen oder innen betrachtet werden kann. Über eine entsprechende Funktion können Animationen, wie „Flüge durch den Zellkern“ als eine Folge von Einzelbildern gespeichert werden. Diese wurden mit Hilfe des Programms Premiere 6 zu entsprechenden Filmsequenzen zusammengefügt.

3. Ergebnisse

3.1 Die Lokalisierung von naszenter RNA bezüglich chromatinarmer Räume im Zellkern

Das „Interchromatin Domain“ (ICD) Modell sagt voraus, dass RNA an den Oberflächen von Chromatin-Domänen synthetisiert wird und in einem Netzwerk chromatinarmer Räume im Zellkern, dem sogenannten ICD-Raum, prozessiert und transportiert wird (Cremer und Cremer, 2001; Cremer et al., 1995; Cremer et al., 1993). Demnach sollte sich naszente RNA im Zellkern vorwiegend an den Oberflächen von Chromatin-Domänen, beziehungsweise in chromatinarmen Räumen im Zellkern befinden. Diese Vorhersage sollte in der vorliegenden Doktorarbeit überprüft werden. Um die Lokalisierung naszenter RNA bezüglich chromatinarmer und chromatinbesetzter Räume im Zellkern zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Doktorarbeit HeLa H2B-GFP Zellen (Kanda et al., 1998) verwendet. Da in diesen Zellen das Histon H2B mit grün fluoreszierendem Protein (GFP) fusioniert war, zeigte die GFP-Fluoreszenz an, welche Räume im Zellkern Chromatin enthielten (siehe auch Sadoni et al., 2001). HeLa H2B-GFP Zellen wurden mit BrUTP markiert, welches in naszente RNA eingebaut wird (Wansink et al., 1993). Die Markierung erfolgte über Mikroinjektion oder Scratch-Labeling (siehe 2.2.10). 10 min nach BrUTP-Markierung wurden die Zellen mit Formaldehyd fixiert, und BrUTP wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz mit Hilfe des Fluorochroms TRITC nachgewiesen. Intensitäten und Verteilungen der TRITC- und GFP-Fluoreszenzen in entsprechenden Zellkernen wurden mittels konfokaler Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) aufgenommen (Pixelgröße x, y: 100 nm x 100 nm, Δz : 250 nm, Abbildung 5). Es wurden insgesamt 27 Zellkerne aus zwei unterschiedlichen Markierungsexperimenten aufgenommen, und mit Hilfe der Programme Metamorph 4.5 und Excel 2000 wie im Folgenden beschrieben ausgewertet.

3.1.1 Bestimmung der Kolokalisation von Chromatin und naszenter RNA

Die CLSM-Aufnahmen wurden in Bezug auf die Frage hin ausgewertet, ob sich naszente RNA bevorzugt in chromatinarmen Räumen befand. Unter diesen Umständen sollte der Grad der Kolokalisation des TRITC-Signals (naszente RNA) mit dem GFP-Signal (Chromatin) relativ gering sein. Bei der Bestimmung des Grades der Kolokalisation bestand die Schwierigkeit, die exakten Grenzen des GFP-Signals im Zellkern festzulegen. Besonders bei Kernbereichen, die eine schwache GFP-Fluoreszenzintensität zeigten, war schwer zu entscheiden, ob diese relativ geringe Mengen an Chromatin enthielten, oder ob dies nur so erschien. Dieses Problem ergibt sich aufgrund des begrenzten Auflösungsvermögens von Lichtmikroskopen und den damit verbundenen Abbildungsartefakten. Auf die Anwendung von Dekonvolutionsprogrammen zur Eliminierung entsprechender Abbildungsartefakte wurde hier verzichtet, da die Verlässlichkeit ihrer Ergebnisse umstritten ist (Falk und Lauf, 2001; Markham und Conchello, 2001; McNally et al., 1999). Anstatt dessen wurde hier zur Auswertung der Daten eine Schwellenwert-Prozedur entwickelt. Dabei wurde der Anteil der GFP-Fluoreszenz in den einzelnen Kernebenen unter ansteigenden Schwellenwerten ermittelt (Abbildung 6). Damit wurde ein steigender Anteil des GFP-Signals erodiert, beginnend mit Signalen schwacher Fluoreszenzintensität, wie sie auch in chromatinarmen Räumen auftraten. Sollte sich die TRITC-Fluoreszenz bevorzugt in diesen Räumen auf-

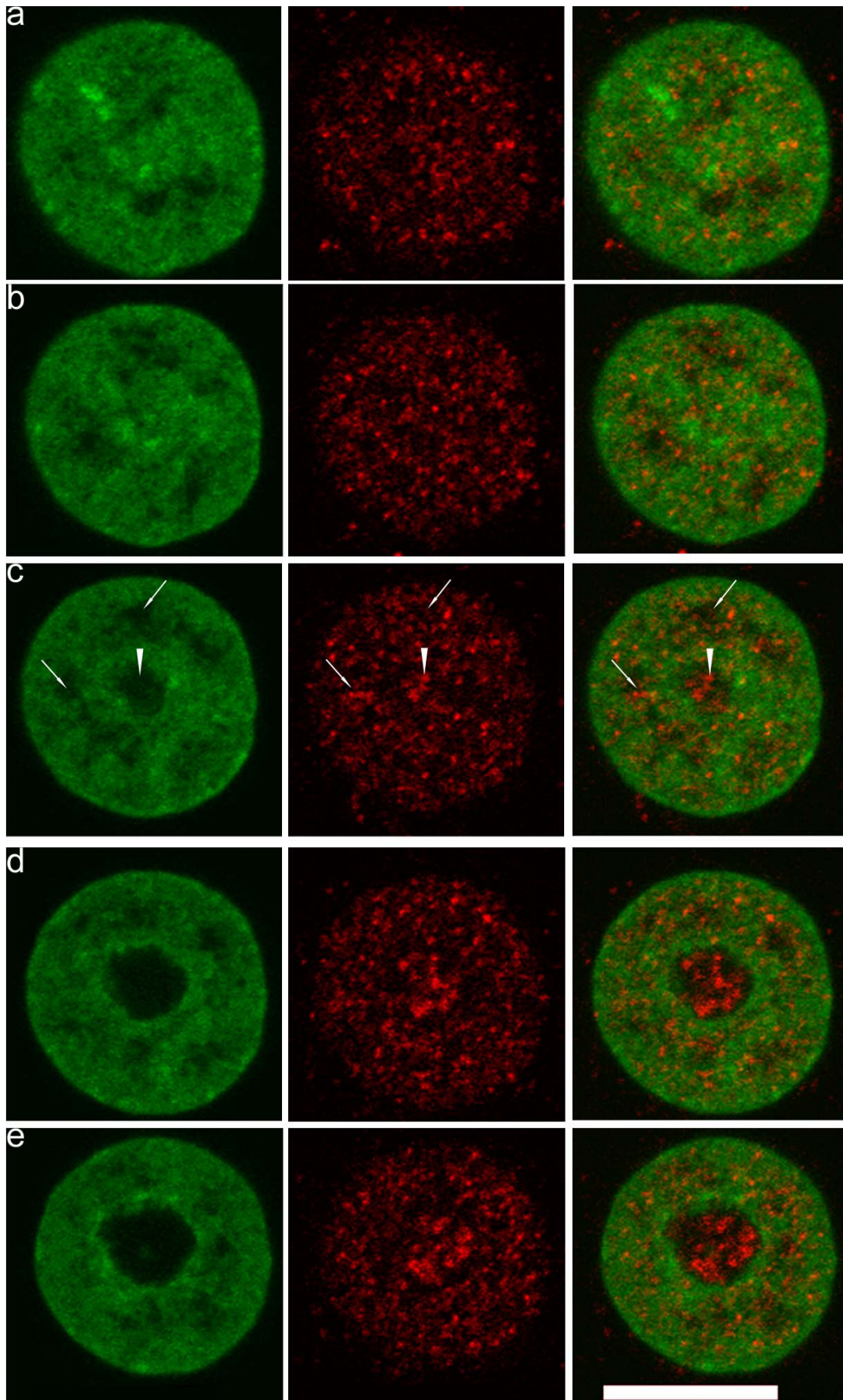


Abbildung 5

Die Reihen a bis e zeigen fünf unterschiedliche Ebenen eines BrUTP markierten HeLa H2B-GFP Zell-

kerns. Die GFP-Fluoreszenz in den unterschiedlichen Ebenen ist in grün gezeigt (links). Die TRITC-Fluoreszenz (BrUTP wurde mittels eines TRITC-konjugierten Antikörpers detektiert) ist in rot gezeigt (Mitte). Die Überlagerungen der TRITC- und GFP-Fluoreszenzen sind jeweils rechts dargestellt. Die Pfeile in c zeigen auf chromatinarme Bereiche im Zellkern, die mit Speckles, PML-Bodies oder Cajal-Bodies assoziiert sind (Sadoni et al., 2001; Zink et al., 2001), die Pfeilspitze deutet auf den Nukleolus. Die Abbildung zeigt die nicht bearbeiteten Rohdaten. Maßstab: 10 μ m.

halten, wäre nach Erosion der schwachen GFP-Signale ein starker Abfall der TRITC/GFP-Kolokalisation zu verzeichnen. Sollte das TRITC-Signal dagegen gleichmäßig über den Kern verteilt sein, ohne besonderen Bezug zur Chromatinverteilung, sollte die Kolokalisation der GFP- und TRITC-Fluoreszenzen in gleichem Maße abnehmen wie die GFP-Fluoreszenz.

Die Schwellenwert-Prozedur wurde folgendermaßen durchgeführt: Der Anteil der GFP-Fluoreszenz in einer gegebenen Kernebene wurde bei neun verschiedenen Schwellenwerten ermittelt. Bei einem Schwellenwert von 10 beginnend wurde das GFP-Signal in 20er Schritten bis zu einem Schwellenwert von 170 erodiert (Abbildung 6). Der Schwellenwert bezog sich auf den Grauwert des GFP-Signals. Für das RNA-Signal wurden vier verschiedene Schwellenwerte gewählt (20, 25, 30 und 35, bezogen auf den Grauwert des TRITC-Signals), um unter anderem zu testen, in wieweit hier das Anlegen von Schwellenwerten in einem „vernünftigen“ Bereich Einfluss auf die Kolokalisation hatte.

In Abbildung 6 ist exemplarisch für die in Abbildung 5 c dargestellte Kernebene gezeigt, wie das Anlegen von Schwellenwerten die Kolokalisation der Signale beeinflusste, bei einem konstanten Wert von 30 für das RNA-Signal und kontinuierlich in 20er Schritten

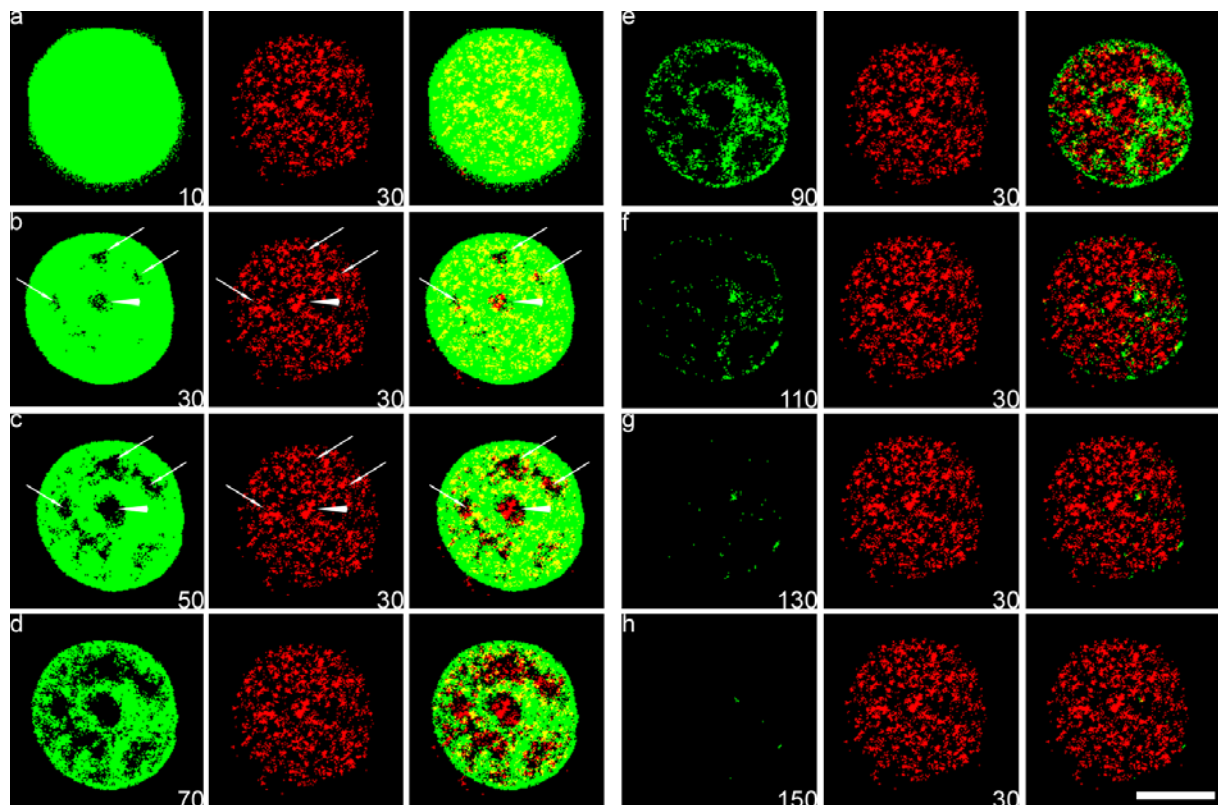


Abbildung 6

Die Abbildung zeigt die in Abbildung 5 c dargestellte Kernebene bei zunehmenden Schwellenwerten

für das GFP-Signal (10 bis 150, 170 nicht gezeigt) und konstantem Schwellenwert (30) für das TRITC-(RNA)-Signal. Die Zahlen geben die verwendeten Schwellenwerte für die gezeigten Signale an. In jeder Reihe (a-h) ist links das GFP-Signal (grün), in der Mitte das TRITC-Signal (rot) und jeweils rechts die Überlagerung (Kokolorisation von rot und grün: gelb) gezeigt. Die Darstellung der Signale ist binär, das heißt, alle Pixel mit einem Grauwert unter dem angegebenen Schwellenwert erscheinen schwarz, während alle Pixel mit einem Grauwert oberhalb des angegebenen Schwellenwert in gleicher Farbintensität dargestellt sind. Pfeile in b und c deuten auf chromatinarme Bereiche, die mit Speckles oder „nuclear bodies“ assoziiert sind (Sadoni et al., 2001; Zink et al., 2001). Die Pfeilspitze in b und c zeigt auf den Nukleolus. Bei einem Schwellenwert von 90 für das GFP-Signal ist kaum noch Kokolorisation (gelb dargestellt) vorhanden, da ab diesem Wert das stärker kondensierte Chromatin des inaktiven Kompartiments (Sadoni et al. 1999) das GFP-Signal dominiert. Maßstab: 10 µm.

zunehmenden Werten für das GFP-Signal. Bei einem Schwellenwert von 90 für das GFP-Signal blieben nur noch perinukleäre und perinukleoläre, sowie einige inselartige Bereiche übrig, die weitgehend mit transkriptionsinaktiven Chromatin übereinstimmten (Sadoni et al. 1999).

Diese Schwellenwert-Prozedur wurde an 27 Kernen durchgeführt, von jedem Kern wurden fünf Ebenen aus der Mitte des Kerns mit einem Abstand von 1 µm ausgewertet. Der Abstand der Ebenen von 1 µm wurde gewählt, um die relativ schlechte Auflösung des konfokalen Mikroskops in z-Richtung zu berücksichtigen und zu verhindern, dass Signale doppelt gezählt wurden. In Abbildung 7 sind die Ergebnisse bezüglich der Kokolorisation der TRITC- und GFP-Signale bei zunehmenden Schwellenwerten für das GFP-Signal und vier unterschiedlichen Schwellenwerten für das RNA-Signal dargestellt. Mit der Software Metamorph 4.5 wurde die Anzahl der Pixel mit GFP-Signal bei jedem Schwellenwert (10 bis 170), die Anzahl der Pixel mit TRITC-Signal und die Anzahl der Pixel mit TRITC- und GFP-Signal (Kokolorisation) bestimmt. Mit Hilfe des Programms Excel 2000 wurde berechnet, welcher Anteil der Pixel mit TRITC-Signal auch ein GFP-Signal innerhalb der Gesamtfläche des Kerns aufweist. Als Gesamtfläche wurde das GFP-Signal bei einem Schwellenwert von 10 definiert (siehe Abbildung 6). Diese Messwerte (dargestellt durch blaue Balken in Abbildung 7) wurden verglichen mit den theoretisch zu erwarteten Werten unter der Annahme, dass die Kokolorisation in dem gleichen Maße wie das H2B-GFP Signal abnahm (Kalkulationswert, dargestellt durch rote Balken in Abbildung 7). Der Kalkulationswert wurde folgendermaßen ermittelt:

$$\text{Kalkulationswert} = (A_x/B) \times C_y,$$

wobei A_x die Anzahl der grünen Pixel (GFP-Signal) beim Schwellenwert x ($x = 10, 30, 50, 70, 90, 110, 130, 150$ oder 170),

B die Anzahl der grünen Pixel (GFP-Signal) beim Schwellenwert 10 und

C_y die Anzahl der gelben Pixel bei einem Schwellenwert für das GFP-Signal von 10 und einem Schwellenwert für das RNA Signal von y ($y = 20, 25, 30$ oder 35) war.

Aus Abbildung 7 wurde folgendes ersichtlich: Unterschiedliche Schwellenwerte für das RNA-Signal hatten einen vernachlässigbaren Einfluss auf die Ergebnisse. Bei gleichem Schwellenwert für das GFP-Signal wurden bei unterschiedlichen Schwellenwerten für das RNA-Signal nahezu gleiche Werte bezüglich der Kokolorisation erhalten. Aus die-

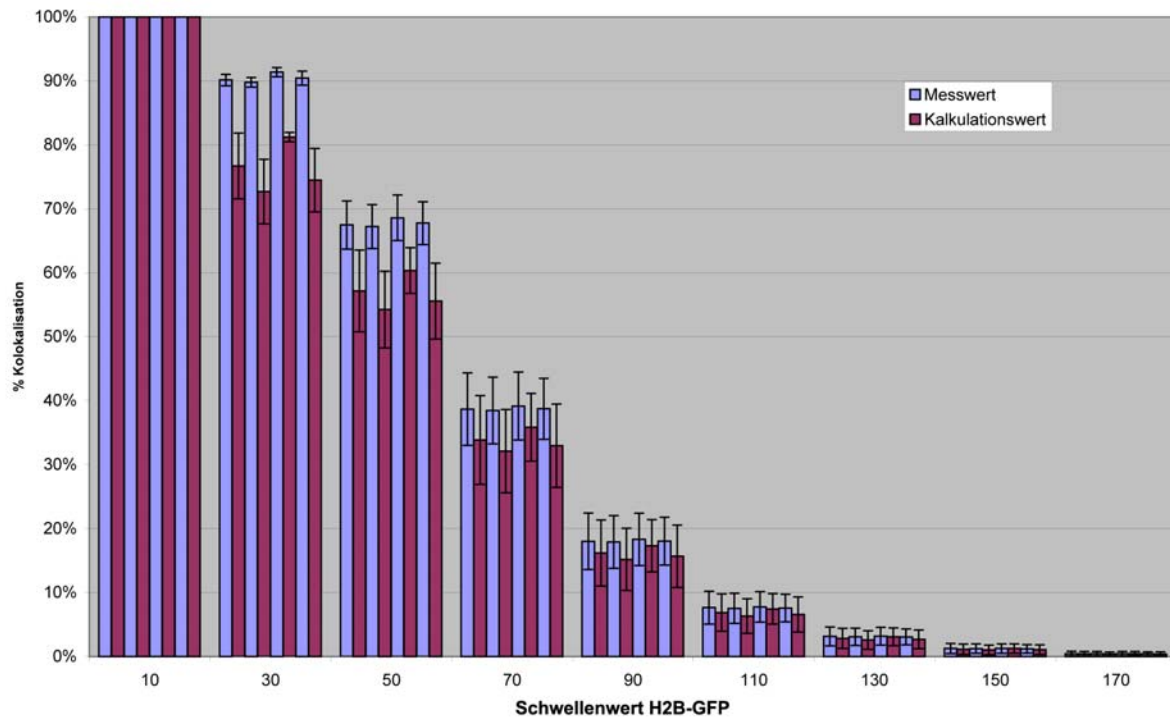


Abbildung 7

Die Abbildung zeigt, welcher Anteil der Pixel mit TRITC-Signal innerhalb der Gesamtfläche (definiert als das GFP-Signal der ausgewerteten Kernebenen bei einem Schwellenwert von 10) auch ein GFP-Signal aufweist (Kolokalisation). Die x-Achse gibt den jeweiligen Schwellenwert für das GFP-Signal an, bei dem der Anteil der Pixel mit kolokalisierenden Signalen ermittelt wurde. Die Werte zeigen die Mittelwerte \pm S. D. der Daten von 27 ausgewerteten Kernen. Von jedem Kern wurden 5 lichtoptische Schnitte ($\Delta Z=1\mu m$) aus den mittleren Kernebenen ausgewertet. Die Messwerte sind durch blaue Balken gezeigt, die Kalkulationswerte sind durch rote Balken symbolisiert. Die vier Mess- und Kalkulationswerte, die für jeden Schwellenwert des GFP-Signals dargestellt sind, repräsentieren die Kolokalisationswerte bei einem Schwellenwert für das TRITC-Signal von 20, 25, 30 und 35 (von links nach rechts).

sem Grunde wurden die ermittelten Daten bei unterschiedlichen Schwellenwerten für das RNA-Signal gemittelt und sind in Abbildung 8 dargestellt.

Bezüglich der in Abbildung 8 dargestellten Werte wurde gefunden, dass der Kalkulationswert und der gemessene Wert signifikant unterschiedlich war bis zu einem Schwellenwert von einschließlich 90 für das GFP-Signal ($p<0,01$, ungepaarter t-Test). Die Messwerte waren von einem Schwellenwert von 30 für das GFP-Signal bis zu einem Schwellenwert von 90 für das GFP-Signal signifikant größer. Das bedeutete, dass das RNA-Signal nicht zufällig über die Kernebenen und unabhängig vom GFP-Signal verteilt war (der Kalkulationswert gab das erwartete Ergebnis bei einer solchen Verteilung an).

Allerdings befand sich die naszente RNA bevorzugt nicht in Bereichen geringer GFP-Fluoreszenzintensität, wie sie chromatinarme Bereiche aufweisen. Wäre dies der Fall, so würde man nach der Erosion niedriger GFP-Fluoreszenzintensitäten (niedrige Schwellenwerte) einen starken Abfall der Messwerte im Vergleich zu den Kalkulationswerten erwarten. Dass die Messwerte, im Gegenteil, bis zu einem Schwellenwert von 90 für das GFP-Signal signifikant größer waren als der Kalkulationswert, zeigte an, dass auch bei zunehmender Erosion der schwächeren GFP-Signale ein größerer Anteil an Kolokalisation erhalten blieb, als dies bei einer zufälligen Verteilung des TRITC-Signals bezüglich der GFP-Fluoreszenzintensität zu erwarten wäre (Kalkulationswert).

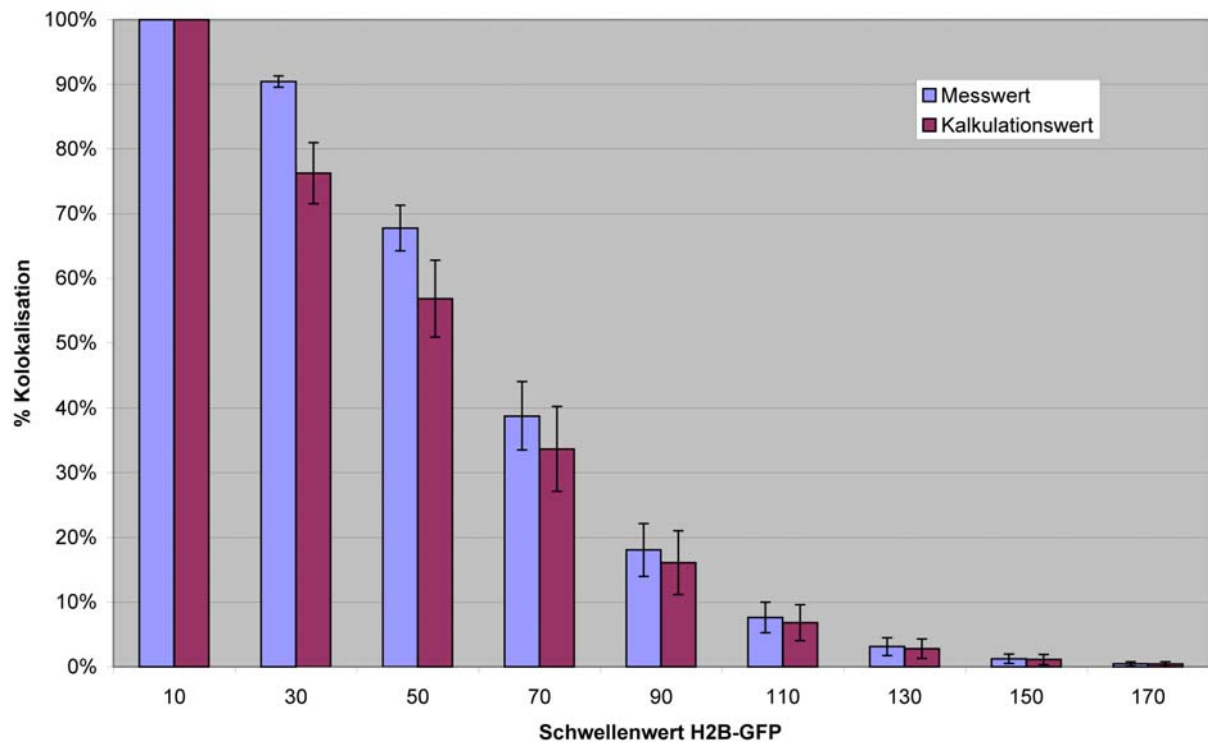


Abbildung 8

Die Abbildung zeigt die Mittelwerte \pm S. D. der in Abbildung 7 dargestellten Daten. Die Mittelwerte wurden gebildet aus den für jeden Schwellenwert des GFP-Signals ermittelten vier unterschiedlichen Messbeziehungsweise Kalkulationswerten.

Dieses Ergebnis zeigte, dass naszente RNA vorwiegend nicht in chromatinarmen Bereichen lokalisiert war, sondern im Gegenteil bevorzugt in Regionen mit einer hohen Chromatindichte lokalisierte.

3.1.2 Bestimmung der Lokalisation naszenter RNA mit Hilfe von Fluoreszenzintensitätsprofilen

Als weitere Methode zur Untersuchung der Frage, ob RNA bevorzugt in chromatinarmen Räumen lokalisiert war, wurden Fluoreszenzintensitätsprofile erstellt (siehe Abbildung 9). Diese Profile zeigten, dass naszente RNA zwar auch in Bereichen mit relativ geringer GFP-Fluoreszenzintensität lokalisiert war (Pfeile in Abbildung 9), wie es ja auch nach den bisherigen Ergebnissen zu erwarten war. Daneben fanden sich aber auch Bereiche geringer GFP-Fluoreszenzintensität, die kein RNA-Signal aufwiesen (kleine Pfeilspitzen in Abbildung 9). Etliche TRITC-Signale mit hoher Fluoreszenzintensität kolokalisierten mit Bereichen, die eine hohe GFP-Fluoreszenzintensität aufwiesen (große Pfeilspitzen in Abbildung 9). Gleiche Ergebnisse wurden sowohl bei Auswertung der Rohdaten, als auch nach Anlegen von Schwellenwerten erhalten. Damit zeigten auch die Fluoreszenzintensitätsprofile, dass naszente RNA nicht vorwiegend in Bereichen geringer GFP-Fluoreszenzintensität lokalisiert war.

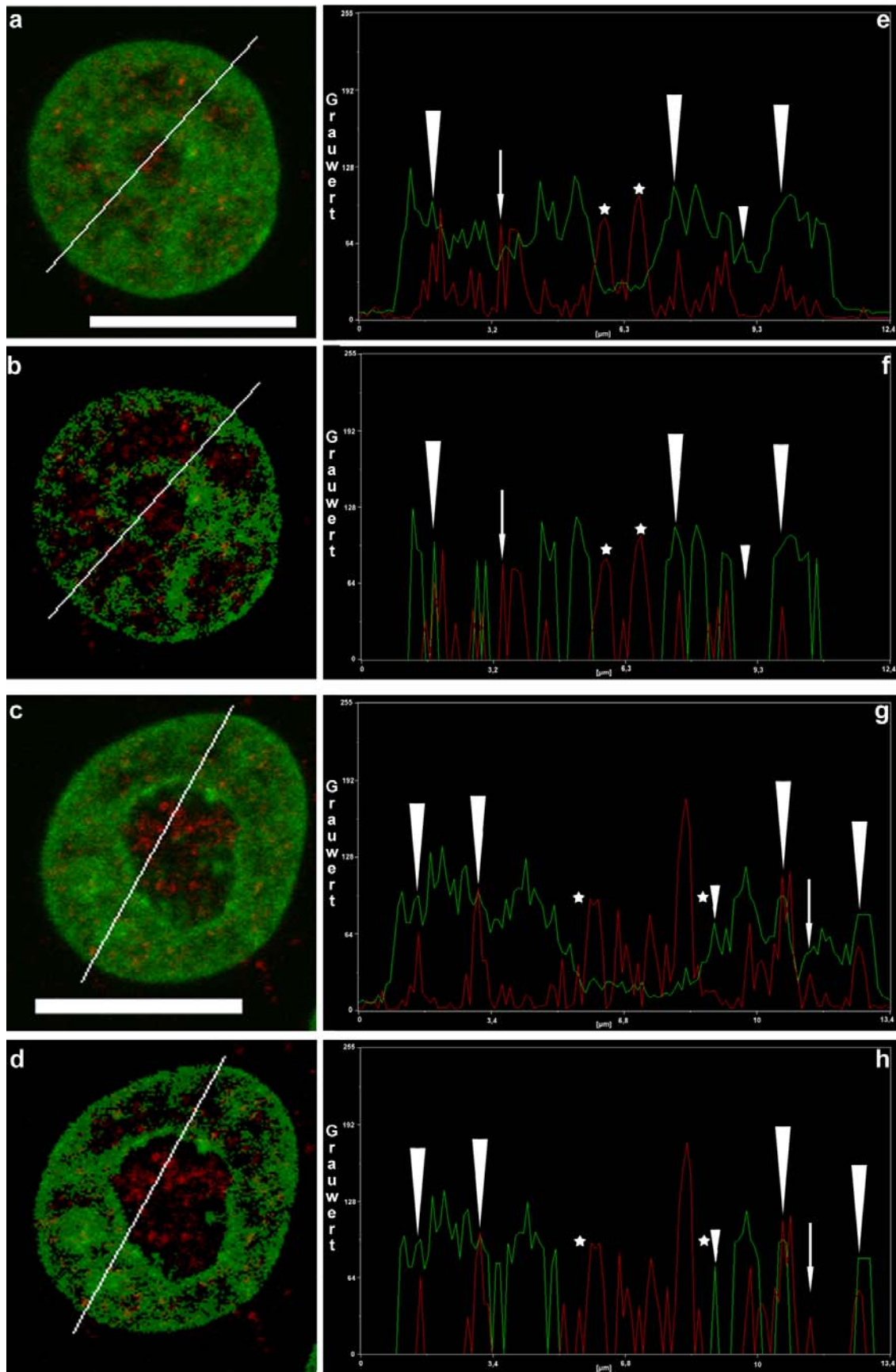


Abbildung 9

Die Abbildung zeigt Fluoreszenzintensitäts-Profile von zufällig ausgewählten Ebenen zweier unterschiedlicher Kerne. Die Überlagerung der TRITC- und GFP-Signale (TRITC-Signal: rot, GFP-Signal:

grün, Kolokalisation: gelb) ist links gezeigt (a, b, c, d). Ausgewertet wurden entweder die Rohdaten (a und c), oder die identischen Bereiche nach Anlegen eines Schwellenwertes von 30 für das TRITC-Signal (in b und d) und von 82 (in b) beziehungsweise 70 (in d) für das GFP-Signal. Die Linien, entlang welcher die Fluoreszenzintensitätsprofile gemessen wurden, sind weiß angezeigt. Die entsprechenden Fluoreszenzintensitätsprofile sind jeweils rechts gezeigt (e, f, g, h). Die grüne Kurve zeigt die GFP-Fluoreszenzintensität, während die rote Kurve die TRITC-Fluoreszenzintensität anzeigt. Die Abszisse gibt die Position entlang der Linie (von unten nach oben) in μm an, während die Ordinate die Grauwerte der Fluoreszenzsignale anzeigt. Die Pfeile deuten auf Bereiche schwacher GFP-Fluoreszenzintensität, die hohe Konzentrationen TRITC-markierter RNA beinhalten. Die kleinen Pfeilspitzen zeigen Bereiche schwacher GFP-Fluoreszenzintensität, in denen sich keine naszente RNA befindet. Die großen Pfeilspitzen zeigen auf Bereiche starker GFP-Fluoreszenzintensität, die hohe Konzentrationen TRITC-markierter RNA beinhalten. Die Sterne markieren die Grenzen des Nukleolus. Maßstab in a und c 10 μm .

3.1.3 Pseudo-3D-Darstellungen der Verteilung naszenter RNA im Verhältnis zu Chromatin

Um einen räumlichen Eindruck der Verteilung naszenter RNA im Verhältnis zu Chromatin zu erhalten, wurde mit Hilfe des Programms Amira 2.3 eine Volumendarstellung erzeugt. Bei dieser Methode wurden dreidimensionale (3D) Skalarfelder visualisiert. Hierbei wurde angenommen, dass von jedem Punkt in dem Datenvolumen Licht emittiert und absorbiert wurde. Die Menge und die Farbe des emittierten Lichts und die Menge der Absorption wurde durch die Skalarwerte determiniert, die eine editierbare Farbpalette benutzten. Daraus wurde dann eine Projektionsdarstellung berechnet

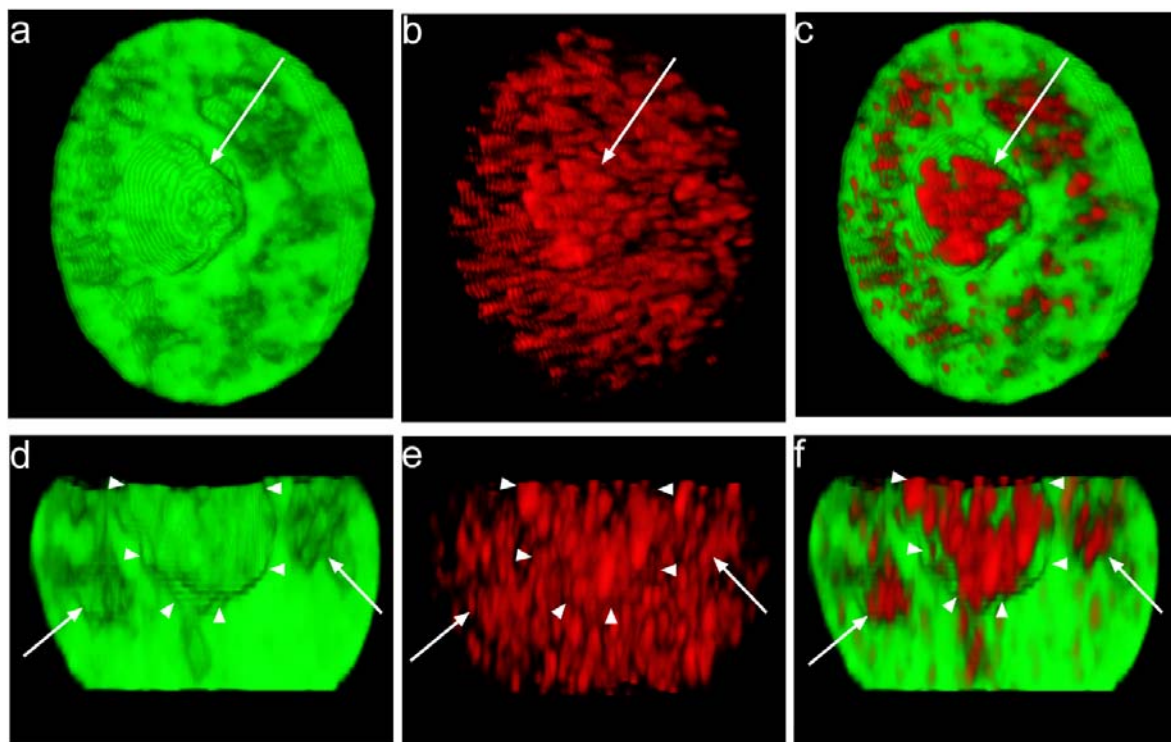


Abbildung 10

Pseudo-dreidimensionale Darstellungen eines Zellkerns einer H2B-GFP (grün) exprimierenden HeLa Zelle mit TRITC markierter naszenter RNA (rot). In a und d ist nur das GFP-Signal dargestellt, in b und e ist nur das TRITC-Signal gezeigt, c und f zeigen die Überlagerungen der jeweiligen Einzelfarbdarstellungen. Die Abbildungen a-c zeigen einen Schnitt durch die x,y-Ebene (leicht gekippt), die Abbildungen d-f zeigen einen orthogonalen Schnitt. Die Pfeile in den Abbildungen a, b und c zeigen auf den Nukleolus. Die Pfeilspitzen in d-f zeichnen den Verlauf des Nukleolusrandes nach und die Pfeile deuten auf

Speckles. Diese Abbildungen sind Momentaufnahmen des Films „H2B-GFP-RNA“ auf der beiliegenden CD.

und durch eine geeignete Grafikkarte dargestellt. Eine Filmsequenz, welche entsprechende Pseudo-3D-Darstellungen zeigt, ist unter dem Namen „H2B-GFP-RNA“ auf der beiliegenden CD zu finden, und kann mit dem Windows Media Player 9 oder dem Quicktime Player 5 abgespielt werden. Einige Einzelbilder dieser Filmsequenz sind in Abbildung 10 gezeigt.

3.2 Untersuchungen zu den topologischen Beziehungen von Speckles und DNA im Zellkern

Nachdem zunächst die Lokalisierung naszenter RNA im Verhältnis zur Organisation der nukleosomalen DNA im Zellkern untersucht worden war, wurden des Weiteren die topologischen Beziehungen von Speckles und DNA im Zellkern untersucht. Speckles enthalten alle zum Spleißen benötigten Faktoren, sowie polyA⁺-RNA unbekannter Funktion (Pederson, 1999; Spector, 1993). Die Funktion von Speckles ist noch unklar. Eine favorisierte Hypothese ist, dass sie aktive Gene mit Spleißfaktoren versorgen (Johnson et al., 2000; Melcak et al., 2000; Misteli, 2000; Misteli et al., 1997). Es konnte bereits für einige Gene gezeigt werden, dass diese im aktiven Zustand mit Speckles assoziiert sind (Misteli et al., 1997; Xing et al., 1995). In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, wie DNA-Fraktionen mit bestimmten funktionellen Eigenschaften mit Speckles assoziiert sind.

3.2.1 Speckles sind mit früh replizierendem Chromatin assoziiert

Funktionell unterschiedliche DNA-Fraktionen wurden mit Hilfe von Cy3-dUTP markiert, das während bestimmter Stadien der S-Phase in die DNA eingebaut wird (Sadoni et al., 1999; Zink et al., 1998). Somit zeigen die erhaltenen Markierungsmuster den Replikationszeitpunkt der markierten DNA. Es konnte bereits gezeigt werden, dass entsprechend markierte DNA nicht nur zu definierten Zeitpunkten repliziert, sondern auch charakteristische Chromatin-Modifikationen und ein spezifisches Transkriptionsverhalten zeigt (Sadoni et al., 1999). So konnte gezeigt werden, dass nur die früh-replizierende DNA transkriptionsaktiv war, während bezüglich später-replizierender DNA auf lichtmikroskopischer Ebene keine transkriptionelle Aktivität nachgewiesen werden konnte (Sadoni et al., 1999). Des weiteren konnte gezeigt werden, dass nur die früh-replizierende DNA stark angereichert war mit hochazetylierten Isoformen von Histon H4 (Sadoni et al., 1999). Somit eignet sich die Replikationsmarkierung sehr gut zur lichtmikroskopischen Darstellung funktionell unterschiedlicher DNA-Fraktionen im Zellkern.

Um die unterschiedlichen DNA-Fraktionen zu markieren, wurde Cy3-dUTP in die Kerne H2B-GFP exprimierender HeLa-Zellen mikroinjiziert. Anschließend wird es für einen Zeitraum von 1 bis 2 Stunden in die DNA eingebaut (Fauth, 1998). Nach dem Einbau der fluoreszierenden Nukleotide war keine weitere Nachweisprozedur nötig, um die DNA-Fraktionen mit bestimmten Replikationszeitpunkten mittels Fluoreszenzmikroskopie sichtbar zu machen (Zink et al., 1998).

Es fiel auf, dass früh-replizierende DNA (siehe Abbildung 11 c, e, f) bevorzugt in der

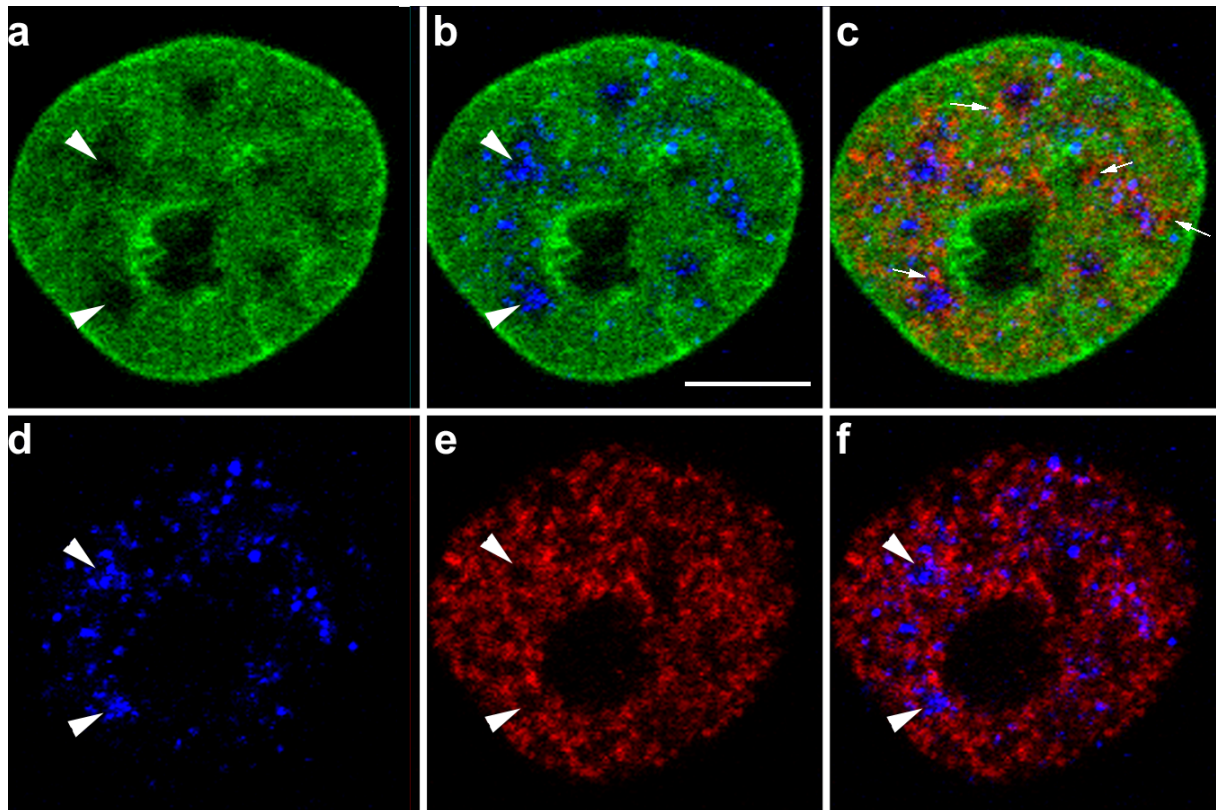


Abbildung 11

Lichtoptische Schnitte eines Zellkerns einer fixierten H2B-GFP (grün) exprimierenden HeLa-Zelle. Die Cy3-markierten Replikationsmuster sind in rot und Speckles (α -SC-35 Immunfärbung) in blau dargestellt. Prominente Speckles in chromatinarmen Regionen sind mit Pfeilspitzen gekennzeichnet. Die Histon H2B-GFP-, Speckles- und Replikationsmuster wurden in jeweils der gleichen Kernebene detektiert. Die Fluoreszenzen sind jeweils einzeln oder in unterschiedlichen Überlagerungen dargestellt. Die Cy3-Markierung zeigt ein frühes Replikationsmuster (typisch für dieses Muster ist der Ausschluss von perinukleärem und perinukleolärem GFP-markiertem Chromatin). Die Pfeile in c deuten auf früh-replizierende DNA (rot) in der Nähe von Speckles, wo nur schwache GFP-Fluoreszenz vorhanden ist. Maßstab: 5 μ m.

Nähe von DNA-armen Speckles (Abbildung 11 b-d, f) in Bereichen relativ schwacher und diffuser GFP-Fluoreszenz (siehe Abbildung 11 a-c) vorhanden war. Diese Beobachtungen legten nahe, dass transkriptionell aktive, früh replizierende DNA des inneren Kompartiments in engem Kontakt zu Speckles stand (siehe auch (Sadoni et al., 2001) zu diesen Befunden). Um diesen Befund weiter zu untersuchen, wurden im folgenden Lebendzellbeobachtungen durchgeführt.

3.2.2 Kontrolle der Lokalisation des Fusionsproteins

Um die Speckles in lebenden Zellen zu markieren, wurden die Zellen transient mit einem Plasmid transfiziert, welches für ein Fusionsprotein bestehend aus dem RS-Motiv (Arginin- und Serin-reiche Aminosäuresequenz) des dtra-Proteins aus *Drosophila* (Li und Bingham, 1991) und dem GFP-Protein kodierte (zur Verfügung gestellt von Dr. M. Cristina Cardoso, MDC Berlin). Dieses Fusionsprotein sollte aufgrund der RS-Domäne in Speckles lokalisieren ((Li und Bingham, 1991) und Dr. M. Cristina Cardoso, persönliche Mitteilung). RS-Domänen sind typisch für Proteine, welche in Speckles

lokalisieren (Lewis und Tollervey, 2000; Li und Bingham, 1991).

Um zu überprüfen, ob das Fusionsprotein tatsächlich in Speckles lokalisierte, wurde SC-35 mit Hilfe einer Immunfärbung in das Fusionsprotein exprimierenden Zellen nachgewiesen. SC-35 ist ein essentieller Spleißfaktor, der ein typischer Bestandteil von Speckles ist (Fu und Maniatis, 1992; Fu und Maniatis, 1990). Abbildung 12 zeigt die Kolo-kalisation von SC-35 und dem Fusionsprotein in Speckles. Zusätzlich lokalisierte das Fusionsprotein auch in Nukleoli, im Gegensatz zu SC-35 (vergleiche Abbildung 12). Die Lokalisierung des Fusionsproteins in Nukleoli entsprach nicht den Erwartungen. Da die Kolo-kalisation mit SC-35 jedoch zeigte, dass die Speckles angemessen mit Hilfe des Fusionsproteins dargestellt werden konnten, und da die Nukleoli gut von den Speckles zu unterscheiden waren, wirkte sich die zusätzliche Lokalisation des Fusionsproteins in den Nukleoli nicht weiter störend auf die Analyse der Speckles aus.

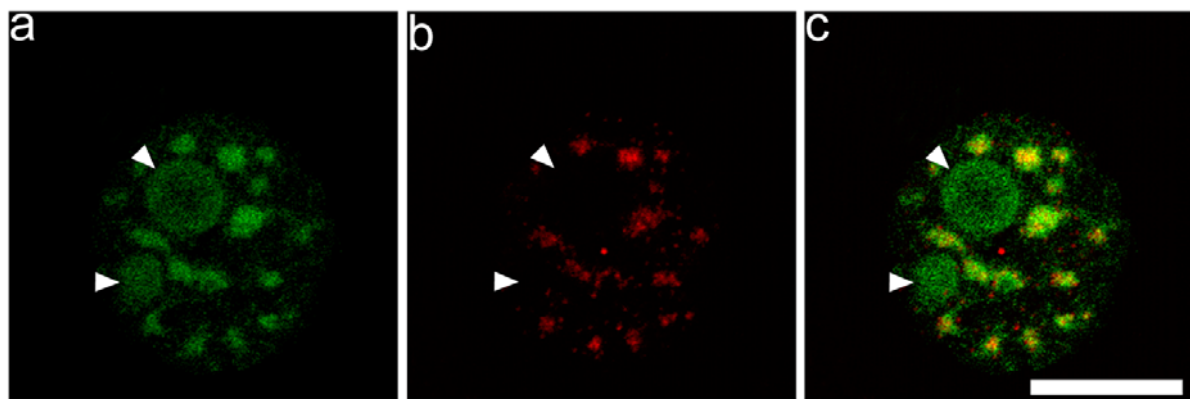


Abbildung 12

Dargestellt ist eine äquatoriale Ebene eines SH-EP N14 Zellkerns. In a ist die dtra-GFP (grün) Lokalisation abgebildet, b zeigt die SC-35 (rot) Lokalisation und c zeigt die Überlagerung. Die Pfeilspitzen zeigen auf Nukleoli. Der Maßstab beträgt 10 µm.

3.2.3 Die Assoziation von Speckles mit unterschiedlichen DNA-Frak-tionen

Um die topologischen Beziehungen von Speckles und unterschiedlichen DNA-Frak-tionen zu untersuchen, wurde das dtra-GFP-Expressionsplasmid zusammen mit Cy3-dUTP in Kerne von „Chinese Hamster Ovary“ (CHO)-Zellen mikroinjiziert. Anhand der Cy3-dUTP Markierungsmuster konnte festgestellt werden, ob die Markierung früh-replizierende und transkriptionell aktive DNA, oder spät-replizierende und transkriptionell inaktive DNA repräsentierte (Sadoni et al., 1999). Außerdem wurde untersucht, inwiefern die transkriptionsinhibierende Droge α -Amanitin diese Beziehungen beeinflusste. 32 doppelt-markierte CHO-Zellkerne wurden analysiert, die mit keinerlei Drogen behandelt worden waren. Hier zeigten sich die Speckles als irregulär geformte, ellipsoide Strukturen, die über weite Bereiche des Kerns verteilt waren (siehe Abbildung 13). Dieses steht in Einklang mit der in der Literatur beschriebenen Morphologie der Speckles (Kumaran et al., 2002; Misteli et al., 1997). Ein Teil des dtra-GFP-Fusionsproteins fand sich diffus über das Nukleoplasma verteilt. Diese diffuse nukleoplasmatische Fraktion fand sich auch bei anderen Proteinen, die in Speckles lokalisieren (Kruhlak et al., 2000; Misteli et al., 1997). Überraschend zeigten sich teilweise direkte Verbindungen zwi-

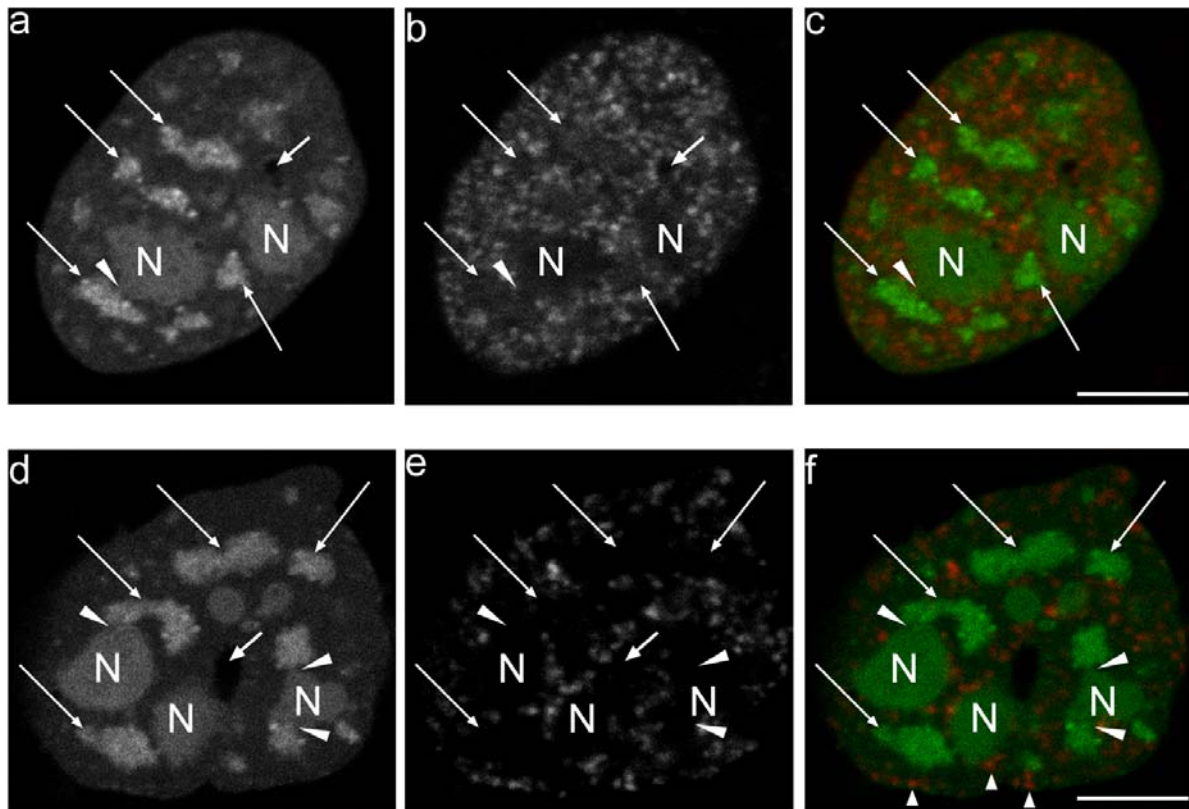


Abbildung 13

Die Abbildung zeigt einzelne lichtoptische Schnitte von zwei Kernen unbehandelter CHO-Zellen (lebend) mit frühem (b) und spätem (e) Replikationsmuster, sowie die GFP-Fluoreszenz in den jeweiligen Kernen (a und d). c und f zeigen die Überlagerungen (Replikationsmuster: rot, GFP-Fluoreszenz: grün). Die langen Pfeile deuten auf einzelne Speckles in a und d; in b und e deuten sie auf die gleichen Kernbereiche. Die großen Pfeilspitzen in a und d zeigen Verbindungen zwischen Speckles und Nukleoli (mit N gekennzeichnet). Die kleinen Pfeilspitzen in f zeigen markiertes Chromatin, das mit den Peripherien des Zellkerns oder eines Nukleolus assoziiert ist. Deutlich ist in b erkennbar, dass in den Bereichen, in denen die Speckles lokalisieren, eine diffuse Cy3-Fluoreszenz vorhanden ist, die sich deutlich vom Hintergrund unterscheidet (siehe auch den ungefärbten Bereich um den Zellkern). Diese diffuse Cy3-Fluoreszenz im Bereich der Speckles ist bei späteren Replikationsmustern nicht zu finden (e). Der kurze Pfeil in a, b, d, e deutet auf für CHO Zellen typische Invaginationen des Zellkerns hin. Maßstab: 5 µm.

schen Speckles und Nukleoli (Abbildung 13). Bezogen auf das früh-replizierende und transkriptionell aktive Chromatin (siehe Abbildung 13 a, b und c) wurde bei der visuellen Inspektion ersichtlich, dass die markierten Foci in engem Kontakt zu den Speckles standen. Ein großer Teil dieser Foci war direkt mit den Peripherien der Speckles assoziiert. Bei dem spät-replizierenden und transkriptionell inaktiven Chromatin (siehe Abbildung 13 d, e und f) zeigte sich diese enge Assoziation mit den Speckles nicht. Dagegen assoziierten etliche dieser Foci erwartungsgemäß mit den Peripherien der Nukleoli und des Zellkerns (siehe Abbildung 13 d-f). In diesen Bereichen des Zellkerns sind Speckles nicht lokalisiert (vergleiche Abbildung 11).

Bei mit dem Transkriptioninhibitor α -Amanitin behandelten CHO-Zellen (33 Kerne untersucht, bei der verwendeten Konzentration von 50 µg/ml α -Amanitin wird nur die RNA-Polymerase II inhibiert (Lindell et al., 1970; Misteli et al., 1997)) veränderte sich die Morphologie der Speckles deutlich. Die irregulär geformten, ellipsoiden Speckles formten sich zu stark abgerundeten Strukturen um (siehe Abbildung 14). Diese Änderung der Morphologie stimmt mit in der Literatur beschriebenen Beobachtungen über-

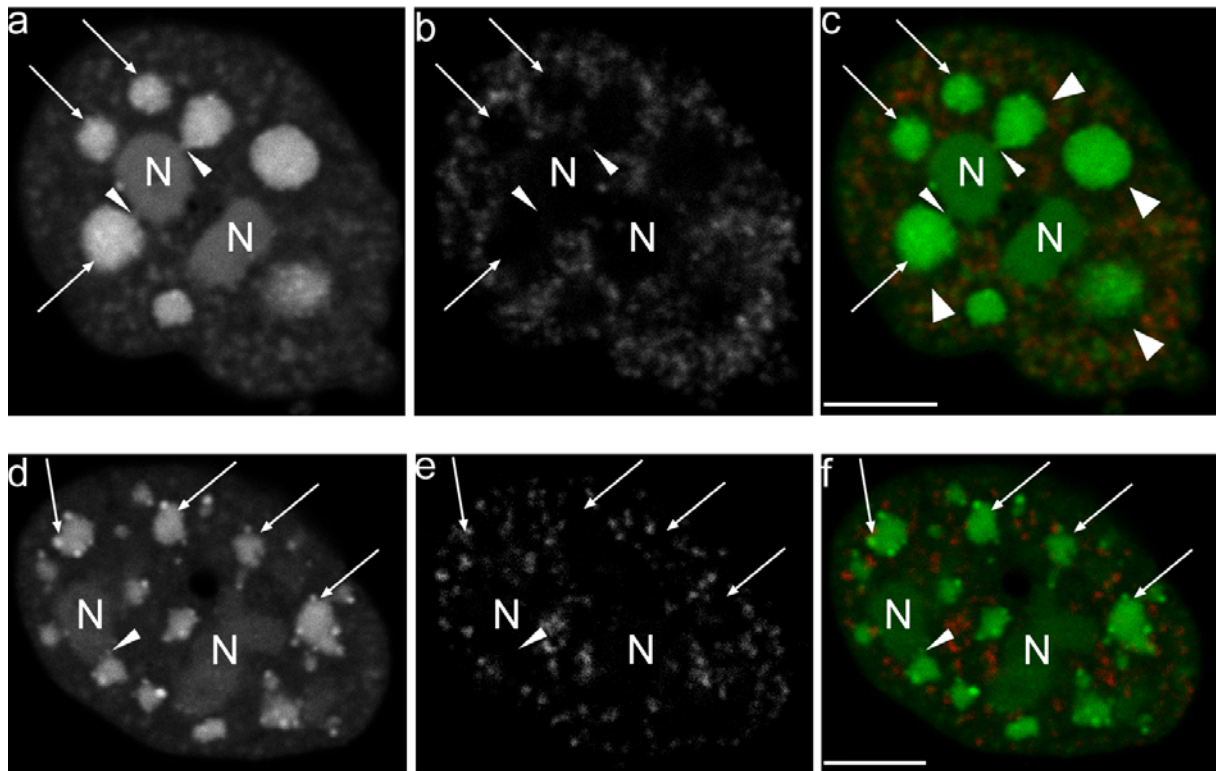


Abbildung 14

Die Abbildung zeigt lichtoptische Schnitte der Kerne von zwei lebenden CHO-Zellen, die mit α -Amanitin behandelt worden waren. Die GFP-Fluoreszenz des Fusionsproteins ist in a und d und die Cy3-Fluoreszenz der markierten DNA ist in b und e gezeigt (Überlagerungen in c und f: markierte DNA rot, GFP-Fluoreszenz grün). In einem der gezeigten Kerne ist die früh-replizierende DNA markiert (a-c), während in dem anderen Kern (d-f) spät-replizierende DNA markiert ist. Die Pfeile zeigen auf einzelne Speckles. Kleine Pfeilspitzen markieren Verbindungen zwischen Speckles und Nukleoli (N). Große Pfeilspitzen markieren „Spalten“ zwischen Speckles und früh-replizierender DNA. Maßstab: 5 μ m.

ein (Misteli et al., 1997). Die Speckles wiesen nach wie vor Kontakt zu den Nukleoli auf (Abbildung 14). Das Nukleoplasma zeigte eine ungleichmäßige GFP-Fluoreszenz und keine gleichmäßige, diffuse Fluoreszenz, wie in unbehandelten Zellen. Eine weitere Veränderung war das Entstehen von „hot spots“ an der Peripherie von Speckles (Abbildung 14 d), die sich in der Fluoreszenzintensität vom Rest des Speckles deutlich unterschieden. Diese „hot spots“ wurden nicht immer beobachtet, beziehungsweise waren aufgrund ihrer Lage auf einzelnen lichtoptischen Schnitten nicht immer zu erkennen, wie bei Abbildung 14 a.

Bezüglich des früh-replizierenden und transkriptionell aktiven Chromatins (Abbildung 14 a, b und c) entstand der Eindruck, dass Speckles und früh replizierendes Chromatin nicht mehr eng miteinander assoziiert waren, und ein „Spalt“ zwischen Speckles und Chromatin entstanden war. Die enge Assoziation zwischen Speckles und früh-replizierender DNA (vergleiche Abbildungen 11 c und 13 c) ist hier nicht mehr zu beobachten. Eine weitere auffällige Änderung im Vergleich zu den nicht mit α -Amanitin behandelten Zellen war, dass keine diffuse Cy3-Fluoreszenz im Bereich der Speckles bei Kernen mit markierter früh-replizierender DNA zu erkennen war (vergleiche Abbildungen 13 b und 14 b).

3.2.4 Die Verteilung der DNA und des dtra-GFP Proteins innerhalb der Speckles

Speckles wurden bisher als DNA-arme, beziehungsweise DNA-freie Kompartimente innerhalb des Zellkerns angesehen (Cremer und Cremer, 2001; Hendzel et al., 1998; Sadoni et al., 2001). Um so erstaunlicher war, dass die visuelle Inspektion der hier erhaltenen Daten zeigte, dass Cy3-Fluoreszenz innerhalb von Speckles in unbehandelten Kernen mit markierter früh-replizierender DNA zu finden war (vergleiche Abbildung 13 b). Dies suggerierte, dass ein Teil der genreichen, früh-replizierenden DNA sich in den Speckles befand, und zwar nur in transkriptionsaktiven Zellen, da eine vergleichbare Cy3-Fluoreszenz innerhalb der Speckles in mit α -Amanitin behandelten Zellen nicht zu beobachten war (vergleiche Abbildung 13 b und 14 b). Um diesem Befund weiter nachzugehen, wurden quantitative Analysen der Fluoreszenzintensitäten innerhalb der Speckles vorgenommen. Zur Kontrolle wurden entsprechende Daten auch von den Nukleoli aufgenommen. Da Nukleoli sich funktionell und morphologisch deutlich von den Speckles unterscheiden, sollten sie ein andersartiges Verhalten bezüglich der Verteilung der Fluoreszenzintensitäten zeigen.

Für die Analyse der Speckles wurden von diesen Histogramme der Fluoreszenzintensitäten aufgenommen. Insgesamt wurden 50 Speckles ausgewertet (26 unbehandelte, 24 mit α -Amanitin behandelte; von jedem Speckle wurden sämtliche lichtoptischen Schnitte berücksichtigt, insgesamt waren es 362). Anschließend wurde für jeden Speckle die mittlere Graustufenintensität bestimmt. Die Werte für die mittleren Graustufenintensitäten wurden nach folgender Formel ermittelt: mittlere Graustufenintensität = $(\sum j \cdot (\text{bin } j * \text{freq } j)) / i$, wobei j bin ein bestimmter Graustufenwert, $\text{freq } j$ die Häufigkeit eines bestimmten Grauwerts und $i = \sum j * (\text{freq } j)$ ist. Mit anderen Worten ist die mittlere Graustufenintensität gleich der Summe der unterschiedlichen Grauwerte, multipliziert mit ihrer Häufigkeit, geteilt durch die Summe der Häufigkeiten. Die mittleren Graustufenintensitäten wurden sowohl für die Cy3-, als auch für die GFP-Fluoreszenzsignale bestimmt. Anschließend wurden die mittleren Graustufenintensitäten normiert. Dazu wurden die Grauwerte des GFP-Signals durch den höchsten gemessenen Wert für das GFP-Signal dividiert, auf gleiche Weise wurde die Normierung für das Cy3-Signal durchgeführt. In Abbildung 15 sind die enthaltenen normierten Grauwerte gezeigt. Jeder grüne Balken repräsentiert den Mittelwert der gewonnenen Daten für die Speckles innerhalb einer Gruppe. Die Abbildung 15 a zeigt, dass die GFP-Fluoreszenz innerhalb der Speckles (grüne Balken) der mit α -Amanitin behandelten Zellen intensiver war als bei den unbehandelten Zellen. Dieser Unterschied war signifikant (siehe Tabelle 1). Das legte nahe, dass das dtra-GFP Fusionsprotein in den Speckles der mit α -Amanitin behandelten Zellen, in welchen die Transkription durch die RNA Polymerase II inhibiert war, weitaus stärker akkumulierte als in den unbehandelten Zellen.

Bezüglich der Cy3-Fluoreszenzintensitäten ergaben sich folgende Befunde: In unbehandelten Zellen, in denen früh-replizierende DNA markiert worden war, wurde innerhalb der Speckles eine signifikant höhere Cy3-Fluoreszenzintensität gemessen, als in unbehandelten Zellen mit markierter spät-replizierender DNA, oder in α -Amanitin behandelten Zellen (siehe Abbildung 15 b und Tabelle 2). Dieses Ergebnis suggeriert, dass ein Teil des genreichen, früh-replizierenden Chromatins in Speckles lokalisiert, aber nur in transkriptionsaktiven Zellen (geringere Cy3-Fluoreszenzintensität in α -Amanitin behandelten Zellen). Dieser Befund ist überraschend, da angenommen wird, dass Speckles keine DNA enthalten (Cremer und Cremer, 2001; Hendzel et al., 1998; Monneron und Bernhard, 1969; Sadoni et al., 2001). Zusätzlich suggeriert das Ergebnis, dass nur eine ganz bestimmte Fraktion der DNA, nämlich die genreiche, früh-re-

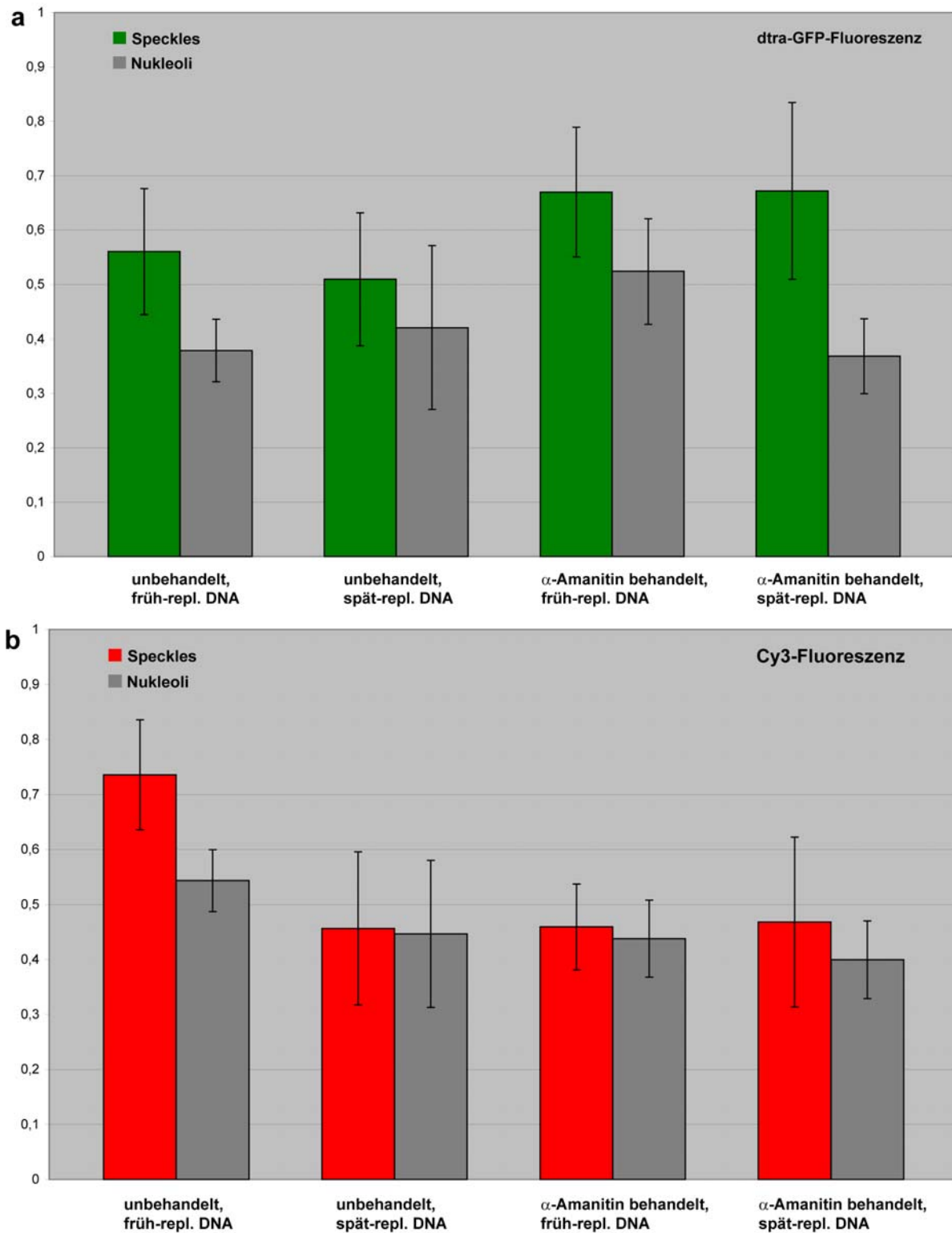


Abbildung 15

Das Balkendiagramm in a zeigt die normierten mittleren Graustufenintensitäten der GFP-Fluoreszenz innerhalb der Speckles (grün) beziehungsweise innerhalb der Nukleoli (grau). Die jeweiligen Fluoreszenzintensitäten sind für die unterschiedlichen Gruppen von analysierten Kernen angegeben. Analysiert wurden unbehandelte Kerne mit markierter früh- oder spät-replizierender DNA, beziehungsweise α -Amanitin behandelte Kerne mit entsprechend markierter DNA. Gezeigt sind für jede Gruppe die Mittelwerte \pm Standardabweichung. Die entsprechenden Daten für die Cy3-Fluoreszenzintensitäten sind in b dargestellt.

plizierende, innerhalb der Speckles lokalisiert, und dass diese DNA die Speckles in transkriptionseinhierten Zellen eventuell wieder „verlässt“.

Zur Kontrolle wurde auch die normierte mittlere Graustufenintensität für die Nukleoli bestimmt. Hierbei wurde davon ausgegangen, dass es sich bei den Nukleoli um relativ DNA-arme Bereiche handelt, und dass α -Amanitin bei den verwendeten Konzentrationen keinen Einfluss auf die nukleoläre Transkription durch die RNA-Polymerase I hat (Lindell et al., 1970). Außerdem sollte die Art der DNA-Markierung keinen Einfluss auf die GFP-Verteilung in den Nukleoli haben.

Insgesamt wurden 26 Nukleoli (14 aus unbehandelten Zellen und 12 mit α -Amanitin behandelten Zellen; von jedem Nukleolus wurden sämtliche lichtoptische Schnitte berücksichtigt, insgesamt waren es 168) analysiert. Dafür wurden ebenfalls entsprechende Histogramme aufgenommen, und die normierte mittlere Graustufenintensität wurde bestimmt (siehe oben). Hier fiel bei der Analyse des GFP-Signals auf, dass die normierte mittlere Graustufenintensität der GFP-Fluoreszenz innerhalb der Nukleoli bei mit α -Amanitin behandelten Zellen mit markierter früh-replizierender DNA signifikant größer war als bei den anderen drei Gruppen (vergleiche Abbildung 15 a und Tabelle 1). Das könnte bedeuten, dass sich das Fusionsprotein in mit α -Amanitin behandelten Zellen nicht nur in den Speckles (siehe oben), sondern auch in den Nukleoli anreichert. Allerdings wurde ein entsprechender Effekt nicht in α -Amanitin behandelten Zellen mit markierter spät-replizierender DNA beobachtet, wobei die DNA-Markierung ja keinen Einfluss auf die Verteilung des Fusionsprotein haben sollte.

Bezüglich des Cy3-Signals innerhalb der Nukleoli ergab sich folgendes Bild: Die normierte mittlere Graustufenintensität des Cy3-Signals war in den Nukleoli der unbehandelten Kerne mit früh-replizierender markierter DNA signifikant größer als bei den anderen drei Gruppen (vergleiche Abbildung 15 b und Tabelle 2). Insgesamt ließe sich dieses Ergebnis damit erklären, dass die in den Nukleoli lokalisierte rDNA auch früh-replizierend ist (Camargo und Cervenka, 1982; Dutrillaux et al., 1976; Kim et al., 1975). Dann müsste jedoch erwartet werden, dass ein gleicher Wert auch bei den α -Amanitin behandelten Zellen mit markierter früh-replizierender DNA zu finden wäre, da α -Amanitin keinen Einfluss auf die Verteilung der rDNA in den Nukleoli haben sollte (α -Amanitin inhibiert bei den verwendeten Konzentrationen nicht die Transkription durch die RNA-Polymerase I in den Nukleoli (Lindell et al., 1970)). Es wurde jedoch entgegen dieser Erwartungen ein signifikanter Unterschied bezüglich des Cy3-Signals bei unbehandelten und α -Amanitin behandelten Zellen mit markierter früh-replizierender DNA gefunden. Insgesamt zeigen die unerwarteten Ergebnisse bei den Kontrollmessungen, dass die bezüglich der Speckles erhaltenen Ergebnisse mit äußerster Vorsicht zu interpretieren sind.

dtra-GFP Fusionsprotein		
dtra-GFP in Speckles	P-Wert	Signifikanter Unterschied
unbehandelt früh, unbehandelt später	0,005	Nein
unbehandelt früh, α -Amanitin früh	<0,0001	Ja
unbehandelt früh, α -Amanitin später	<0,0001	Ja
unbehandelt später, α -Amanitin früh	<0,0001	Ja
unbehandelt später, α -Amanitin später	<0,0001	Ja
Amanitin früh, α -Amanitin später	0,9225	Nein
dtra-GFP in Nukleoli		
unbehandelt früh, unbehandelt später	0,1031	Nein
unbehandelt früh, α -Amanitin früh	<0,0001	Ja
unbehandelt früh, α -Amanitin später	0,4775	Nein
unbehandelt später, α -Amanitin früh	<0,0001	Ja
unbehandelt später, α -Amanitin später	0,0462	Nein
Amanitin früh, α -Amanitin später	<0,0001	Ja

Tabelle1:

Die normierten mittlere Graustufenintensitäten der GFP-Fluoreszenzen innerhalb der Speckles wurden mittels eines ungepaarten t-Tests miteinander verglichen. Verglichen wurden die Werte, die für unbehandelte und α -Amanitin behandelte Zellen mit markierter früh-replizierender (früh) oder spät-replizierender (spät) DNA erhalten wurden (vergleiche Abbildung 15 a). Entsprechend wurden die normierten mittleren Graustufenintensitäten der GFP-Fluoreszenzen innerhalb der Nukleoli miteinander verglichen. Das Signifikanzniveau betrug $p \leq 0,001$.

Cy3-Fluoreszenz		
Cy3 in Speckles	P-Wert	Signifikanter Unterschied
unbehandelt früh, unbehandelt später	<0,0001	Ja
unbehandelt früh, α -Amanitin früh	<0,0001	Ja
unbehandelt früh, α -Amanitin später	<0,0001	Ja
unbehandelt später, α -Amanitin früh	0,85	Nein
unbehandelt später, α -Amanitin später	0,5894	Nein
Amanitin früh, α -Amanitin später	0,6149	Nein
Cy3 in Nukleoli		
unbehandelt früh, unbehandelt später	<0,0001	Ja
unbehandelt früh, α -Amanitin früh	<0,0001	Ja
unbehandelt früh, α -Amanitin später	<0,0001	Ja
unbehandelt später, α -Amanitin früh	0,6788	Nein
unbehandelt später, α -Amanitin später	0,0475	Nein
Amanitin früh, α -Amanitin später	0,0121	Nein

Tabelle2:

Die normierten mittleren Graustufenintensitäten der Cy3-Fluoreszenzen innerhalb der Speckles wurden mittels eines ungepaarten t-Tests miteinander verglichen. Verglichen wurden die Werte, die für unbehandelte und α -Amanitin behandelte Zellen mit markierter früh-replizierender (früh) oder spät-replizierender (spät) DNA erhalten wurden (vergleiche Abbildung 15 b). Entsprechend wurden die normierten mittleren Graustufenintensitäten der Cy3-Fluoreszenzen innerhalb der Nukleoli miteinander verglichen. Das Signifikanzniveau betrug $p \leq 0,001$.

3.2.5 Analyse der Assoziation von unterschiedlichen DNA-Fraktionen mit Speckles mit Hilfe von Fluoreszenzintensitätsprofilen

Um den in 3.2.3 (vergleiche Abbildung 14 c) beschriebenen Effekt der „Spaltbildung“ zwischen Speckles und dem früh-replizierenden Chromatin, induziert durch α -Amanitin, weiter zu untersuchen, wurde die Assoziation von Speckles mit markierter DNA mit Hilfe von Fluoreszenzintensitätsprofilen analysiert. Dabei wurden entlang einer Linie Pixel für Pixel die Intensitäten der GFP-Fluoreszenz und der Cy3-Fluoreszenz gemessen. Entsprechende Diagramme zeigen dann die Intensitätsverläufe entlang der Linien an (siehe Abbildung 16 und 17). Untersucht wurden wieder doppelt-markierte, lebende CHO-Zellen, die mit α -Amanitin behandelt worden waren, oder unbehandelt geblieben waren.

Die Fluoreszenzintensitätsprofile von unbehandelten Zellkernen (siehe Abbildung 16) zeigten wieder eine enge Assoziation von Speckles mit früh-replizierender DNA. Die Peripherien der Speckles überlappten in den meisten Fällen ganz, oder teilweise mit benachbarten DNA-Foci (DNA-Foci sind erkennbar als „Peaks“ der Cy3-Fluoreszenzintensität).

Dagegen zeigten entsprechende Fluoreszenzintensitätsprofile von α -Amanitin behandelten Zellen deutliche Abstände zwischen den Rändern der Speckles und den markierten DNA-Foci. Die Abstände zwischen benachbarten Maxima der Cy3- und GFP-Fluoreszenzen (siehe Pfeilspitzen in Abbildung 17) lagen zwischen circa 400 nm und 1100 nm. Die entsprechenden Abstände von unbehandelten Zellen lagen dagegen in Bereichen von circa -130 bis +350 nm (bei negativen Werten liegt das lokale Maximum der Cy3-Fluoreszenzintensität innerhalb des Speckles, siehe mittleres Diagramm in Abbildung 16).

Diese Ergebnisse zeigten deutlich, dass eine enge Assoziation zwischen Speckles und früh-replizierendem, transkriptionell aktivem Chromatin bestand. Diese Assoziation scheint abhängig zu sein vom Prozess der Transkription, da es in transkriptionssinhibierten Zellen zu einer dynamischen Reorganisation und zum Verlust dieser engen Assoziation kommt.

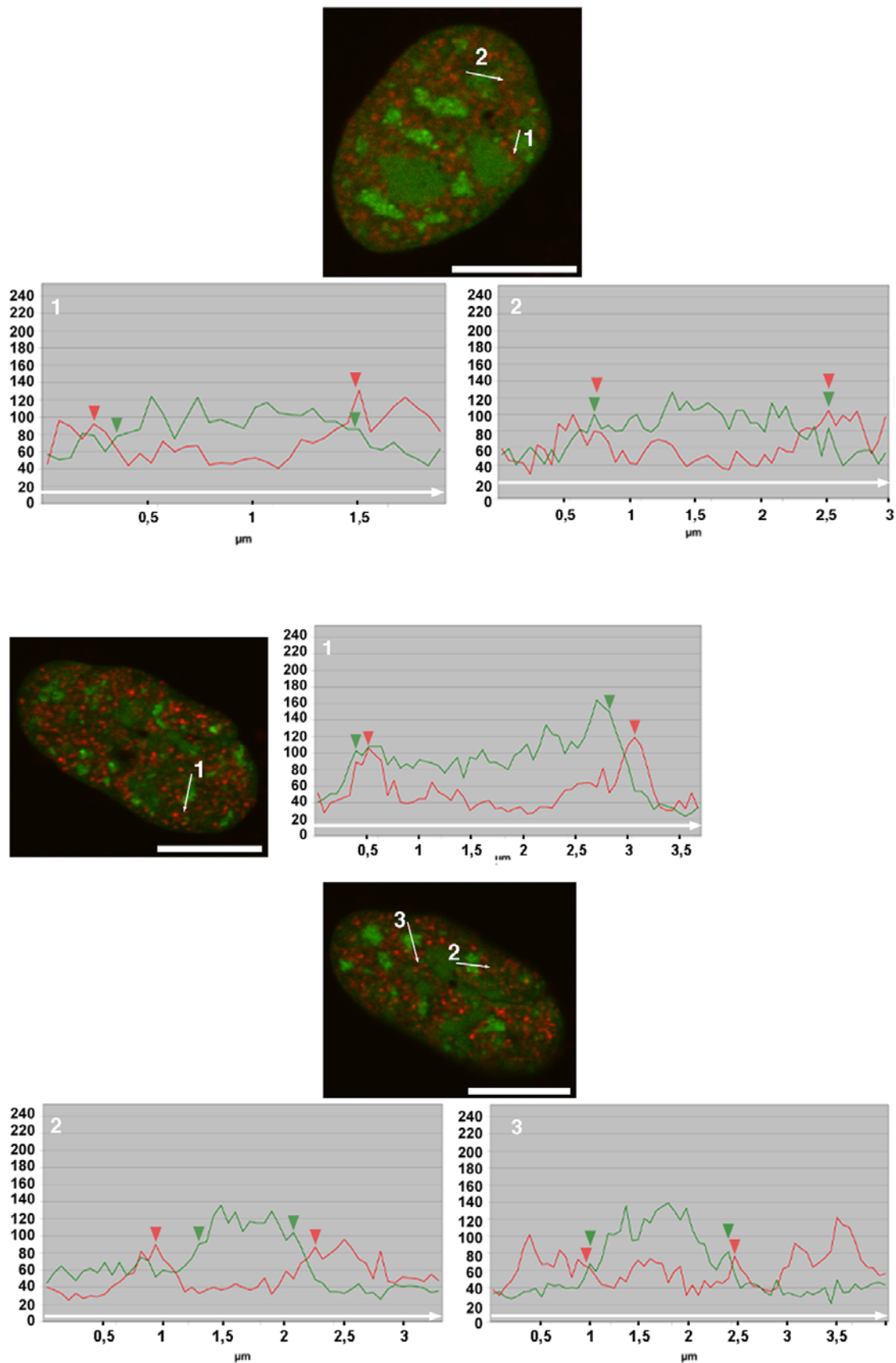


Abbildung 16

Die Abbildung zeigt drei lichtoptische Schnitte aus zwei unterschiedlichen unbehandelten und lebenden CHO-Kernen (Cy-3 Fluoreszenz: rot, GFP-Fluoreszenz: grün). Von einzelnen Speckles wurden Fluoreszenzintensitätsprofile aufgenommen. Lage und Richtung der Fluoreszenzintensitätsprofile ist durch weiße Pfeile in der jeweiligen Abbildung des Kerns beziehungsweise im dazugehörigen Diagramm

angezeigt. Die Nummern in der Abbildung des Kerns entsprechen den Nummern im Diagramm. In den Diagrammen sind die Intensitätsprofile der GFP-Fluoreszenz durch grüne Kurven angezeigt, während die Intensitätsprofile der Cy3-Fluoreszenz durch rote Kurven dargestellt sind. Die Pfeilspitzen in den Diagrammen deuten auf den Speckles am nächsten liegende Chromatinfoci (rot) beziehungsweise die Ränder der Speckles (grün). Die X-Achse hat als Maßeinheit μm , die Y-Achse zeigt die Werte für die Graustufenintensitäten (0 bis 254). Die Maßstäbe betragen $10\ \mu\text{m}$.

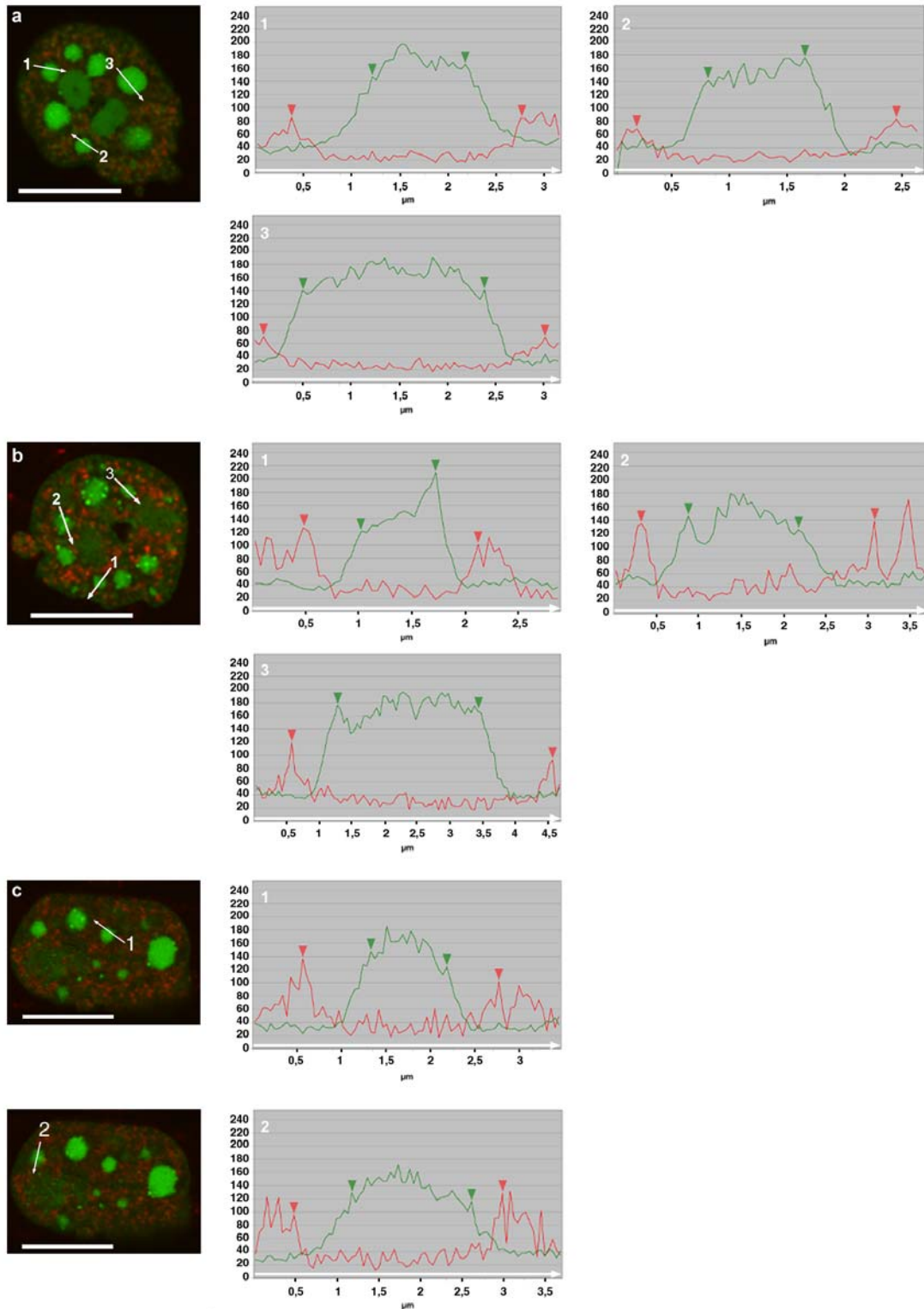


Abbildung 17

Die Abbildung zeigt vier lichtoptische Schnitte aus drei unterschiedlichen mit α -Amanitin behandelten

lebenden CHO-Kernen (Cy-3 Fluoreszenz: rot, GFP-Fluoreszenz: grün). Von einzelnen Speckles wurden Fluoreszenzintensitätsprofile aufgenommen. Lage und Richtung der Fluoreszenzintensitätsprofile sind durch weiße Pfeile in der jeweiligen Abbildung des Kerns beziehungsweise im dazugehörigen Diagramm daneben angezeigt. Die Nummern in der Abbildung des Kerns entsprechen den Nummer im Diagramm. In den Diagrammen sind die Intensitätsprofile der GFP-Fluoreszenz durch grüne Kurven angezeigt, während die Intensitätsprofile der Cy3-Fluoreszenz durch rote Kurven dargestellt sind. Die Pfeilspitzen in den Diagrammen deuten auf den Speckles am nächsten liegende Chromatinfoci (rot) beziehungsweise die Ränder der Speckles (grün). Die X-Achse hat als Maßeinheit μm , die Y-Achse zeigt die Werte für die Graustufenintensitäten (0 bis 254). Die Maßstäbe betragen 10 μm .

3.3 Untersuchungen zur dynamischen Interaktion der Replikationsmaschinerie mit DNA in lebenden Zellen

3.3.1 Untersuchung der Dynamik von Replikationsfoci

Bevor die Interaktion der Replikationsmaschinerie (RM) mit DNA untersucht wurde, sollten die dynamische Eigenschaften der Replikationsfoci in der S-Phase näher charakterisiert werden. Replikationsfoci wurden mittels eines GFP-PCNA Fusionsproteins dargestellt (Leonhardt et al., 2000). Das Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) ist ein essentieller Faktor bei der Replikation und bildet einen homotrimerischen Ring um die DNA (Wyman und Botchan, 1995). HeLa S6-Zellen wurden mit dem für GFP-PCNA kodierenden Expressionsplasmid (siehe Material und Methoden) entweder mikroinjiziert, oder transient transfiziert, und am nächsten Tag an einem konfokalen Laserscanningmikroskop untersucht. Als Negativkontrolle wurden GFP-PCNA exprimierende Zellen mit Mimosin behandelt, das die Replikation inhibiert (Kalejta und Hamlin, 1997). In diesen Zellen sollten sämtliche beobachteten dynamischen Prozesse nicht vom Replikationsprozess herrühren. Zur Kontrolle für eventuelle Bewegungen des apparativen Aufbaus, die dynamische Bewegungen der Replikationsfoci vortäuschen könnten, wurden mit Formaldehyd fixierte Zellen aufgenommen.

Über einen Zeitraum von 1030 Sekunden (entspricht 17 min und 10s) wurde alle 103s ein HeLa S6-Kern komplett gescannt. Die Untersuchungen wurden vornehmlich an Zellen in der zweiten Hälfte der S-Phase durchgeführt, da frühe S-Phasen aufgrund der hohen Dichte an Replikationsfoci kaum auszuwerten sind. Aus den konfokalen Serien wurden in jedem Zellkern Foci-Paare ausgewählt. Die relativen Distanzen zwischen den beiden Foci eines Paares wurden für jeden Zeitpunkt vermessen. Die Vermessung der relativen Distanzen zweier Objekte innerhalb eines Zellkerns ist eine etablierte Methode, um Einflüsse von Bewegungen des gesamten Zellkerns auf die Messungen zu minimieren (Chubb et al., 2002; De Boni und Mintz, 1986; Marshall et al., 1997; Parvinen und Soderstrom, 1976). Alle Kernebenen, die Foci von Interesse enthielten, wurden in eine Ebene projiziert. Anhand dieser Projektionen wurden die Distanzen der Intensitätszentren der Foci zu jedem Zeitpunkt mit Hilfe der Software Metamorph 4.5 vermessen.

Foci-Paare aus drei Kategorien wurden analysiert (siehe Abbildung 18 a): 1) perinukleäre Foci mit langen Distanzen zueinander (Abstand über 10 μm), 2) perinukleäre und perinukleoläre Foci mit kurzen Distanzen zueinander (Abstand bis 4 μm) und 3) nukleoplasmische Foci (Abstand bis 6 μm). Von jeder Kategorie wurden mindestens 30 Foci-Paare analysiert. Dies wurde einmal in mit Mimosin behandelten Kernen durchgeführt, und nochmals mit unbehandelten Kernen durchgeführt. Bei den fixierten Kontrollen wurden pro Kategorie auch jeweils circa 30 Foci-Paare ausgewertet.

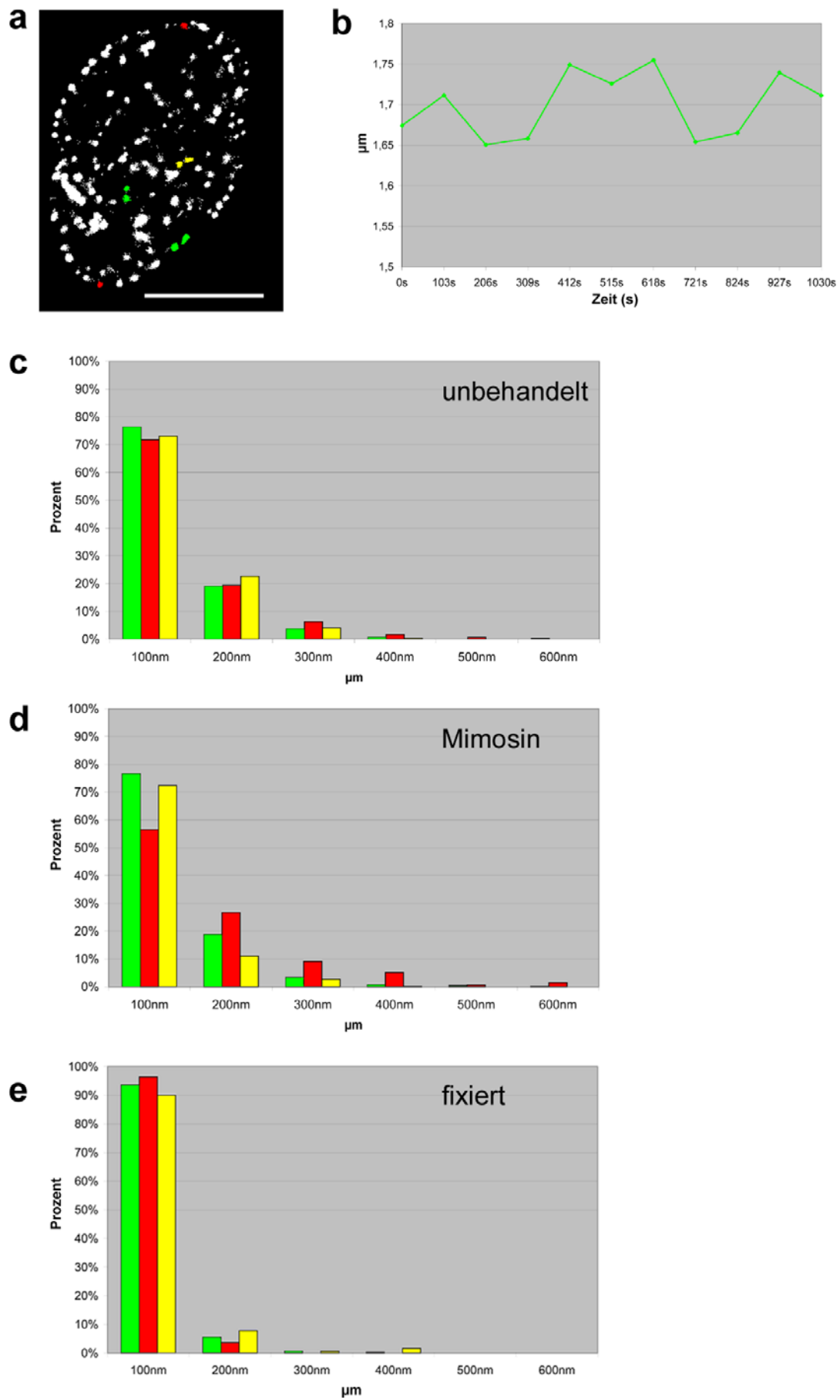


Abbildung 18

(a) zeigt exemplarisch die drei untersuchten Kategorien von GFP-PCNA markierten Foci-Paaren: die

zwei rot markierten Foci bilden ein Paar der Kategorie der perinukleären Foci mit langen Distanzen. Die grün markierten Foci zeigen je ein Paar perinukleärer beziehungsweise perinukleolärer Foci mit kurzen Distanzen, während die zwei gelb markierten Foci ein Paar nukleoplasmischer Foci zeigen. Die restlichen GFP-PCNA markierten Foci in dieser Projektion sind in weiß dargestellt. Alle 103 Sekunden wurden Abstandsmessungen der Intensitätszentren ausgewählter Foci-Paare vorgenommen über einen Zeitraum von 1030 Sekunden. Eine typische Messkurve für ein Foci-Paar der Kategorie „perinukleäre beziehungsweise perinukleoläre Foci mit kurzen Distanzen“ ist in (b) dargestellt. Die Y-Achse zeigt die Abstände der Intensitätszentren, die X-Achse gibt die Zeit an. (c) zeigt die Größenordnungen (0-100 nm, 101-200 nm usw.) der gemessenen Abstandsänderungen innerhalb eines 103 s Zeitintervalls (alle 103 s Zeitintervalle für alle Foci-Paare dargestellt) bei unbehandelten lebenden Zellen. Die Y-Achse zeigt den prozentualen Anteil der Foci-Paare mit Abstandsänderungen pro 103 s innerhalb eines auf der X-Achse gezeigten Abstandsintervalls. Die Farben der Balken entsprechen den Foci-Kategorien, wie in (a) dargestellt. (d) zeigt die entsprechenden Werte für Mimosin behandelte, lebende Zellen, während (e) die entsprechenden Werte für fixierte Zellen zeigt. Der Maßstab in (a) beträgt 10 μ m.

Die Messungen der Abstandsänderungen zeigten, dass sich die Foci eines Paares in Bereichen von wenigen 100 nm abwechselnd aufeinander zu und voneinander weg bewegten (Ansteigen und Abfallen der Kurve in Abbildung 18 b). 90 % aller Abstandsänderungen bei lebenden Zellen fanden in einem Intervall bis 200 nm statt (vergleiche Abbildung 18 c und d), wobei sich die meisten Änderungen auf einen Intervall bis 100 nm beschränkten. Eine Tendenz zu weiteren Abstandsänderungen war bei perinukleären Foci mit langen Distanzen zu beobachten (vergleiche rote Balken in Abbildung 18 c und d), im Vergleich zu den anderen beiden Foci-Kategorien. Ein Unterschied zwischen unbehandelten und mit Mimosin behandelten lebenden Zellen war nicht zu beobachten. Bei fixierten Zellen fanden circa 90 % aller beobachteten Abstandsänderungen im Bereich bis 100 nm statt (siehe Abbildung 18 e). Diese sehr kleinen Abstandsänderungen reflektieren weitgehend Bewegungen im apparativen Aufbau und Messfehler.

Da während der kurzen Messintervalle von je 103s keine großen Distanzänderungen detektiert wurden, wurde als nächstes untersucht, was die jeweils maximalen Abstandsänderungen innerhalb des Beobachtungszeitraums von circa 17 min (1030s) waren. Die maximalen Abstandsänderungen wurden dadurch bestimmt, dass der kleinste gemessene Abstand der Intensitätszentren eines Foci-Paares von dem während des gesamten Beobachtungszeitraums maximalen gemessenen Abstand subtrahiert wurde. In Abbildung 19 sind die Ergebnisse zusammengefasst. Bezüglich der unbehandelten Zellen, der mit Mimosin behandelten Zellen und der fixierten Zellen wurden jeweils 100 Foci-Paare analysiert. Es wird ersichtlich, dass sich die maximalen Distanzänderungen der Foci-Paare bei lebenden Zellen in einem Bereich von 200 nm bis 600 nm abspielten. Eine Tendenz hin zu größeren maximalen Abstandsänderungen fand sich bei der Kategorie „perinukleäre Foci mit langen Abständen“ (rote Balken in Abbildung 19). Insgesamt waren keine Unterschiede zwischen unbehandelten und mit Mimosin behandelten lebenden Zellen erkennbar. Fixierte Zellen zeigten insgesamt deutlich geringe maximale Abstandsänderungen der Foci eines Paares (vergleiche Abbildung 19 c). Dieses Ergebnis zeigt, dass die in lebenden Zellen beobachtete Dynamik nur zu einem geringen Teil auf Messfehler und Bewegungen des apparativen Aufbaus zurückzuführen ist.

Da die Replikation in Mimosin behandelten Zellen inhibiert ist, können die hier beobachteten Abstandsänderungen nicht auf replikationsabhängige, dynamische Umlagerungen zurückzuführen sein. Der Befund, dass bei Foci-Paaren mit langen Distanzen größere Abstandsänderungen gefunden wurden, legt nahe, dass die beobachteten Abstandsänderungen im wesentlichen auf generelle Änderungen der Kernmorpho-

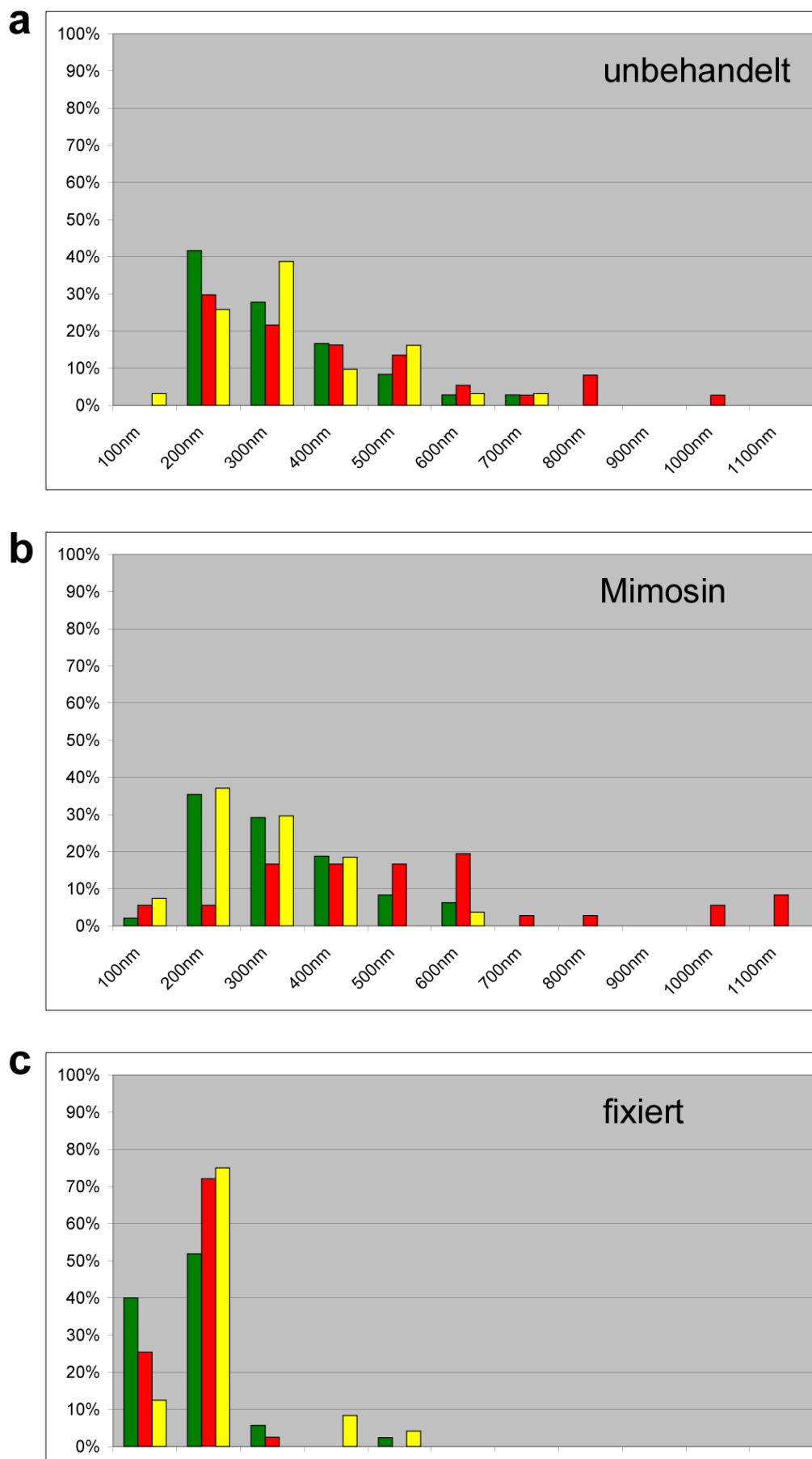


Abbildung 19

Dargestellt sind die maximalen Distanzänderungen von GFP-PCNA-Foci eines Paares während des

Beobachtungszeitraums von circa 17 min (1030s). (a) zeigt die Größenordnungen (0-100 nm, 101-200 nm usw.) von sämtlichen maximalen Abstandsänderungen aller Foci-Paare bei unbehandelten lebenden Zellen. Die Y-Achse zeigt den prozentualen Anteil der Foci-Paare mit maximalen Abstandsänderungen innerhalb eines auf der X-Achse gezeigten Intervalls. Die Farben der Balken entsprechen den Foci-Kategorien, wie in Abbildung 18 a dargestellt. (b) zeigt die entsprechenden Werte für Mimosin behandelte, lebende Zellen, während (c) die entsprechenden Werte für fixierte Zellen zeigt.

logie während des Beobachtungszeitraums zurückzuführen sind. Der Einfluss von Änderungen der Kernmorphologie sollte bei Foci-Paaren mit langen Abständen größer sein als bei Foci-Paaren mit kurzen Abständen.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass GFP-PCNA-Foci im gemessenen Zeitraum von 1030s (circa 17 min) bestimmte Positionen im Zellkern besetzen, an welchen sie sehr kleinräumige, positionelle Schwankungen zeigen. Diese scheinen nicht durch den Replikationsprozess bedingt zu sein, denn gleiche positionelle Schwankungen wurden auch in mit Mimosin behandelten Zellen beobachtet, in denen die Replikation inhibiert ist.

3.3.2 Die Interaktion von DNA und Replikationsfoci in lebenden Zellen

Nachdem gezeigt wurde, dass die Replikationsmaschinerie sehr kleinräumige, positionelle Schwankungen vollführte, sollte der Prozess der DNA-Replikation in lebenden HeLa S6 Zellen weiter untersucht werden. Hierbei sollte erstmals die dynamische Interaktion der Replikationsmaschinerie mit naszenter und replizierender DNA in lebenden, eukaryontischen Zellen untersucht werden. Die Replikationsmaschinerie wurde, wie oben beschrieben, mittels GFP-PCNA markiert (Leonhardt et al., 2000). Simultan wurden die naszente, oder die replizierte DNA mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Nukleotiden visualisiert (Zink et al., 1998). Alle Untersuchungen wurden an menschlichen HeLa S6-Zellen durchgeführt. Alle Bilddaten wurden mit Hilfe der konfokalen Laser-scanningmikroskopie erhoben, um in allen Fällen die räumliche Situation im Zellkern nachvollziehen zu können.

Während der Arbeiten wurden besonders zwei Fragestellungen berücksichtigt. Replikationsfoci erscheinen während bestimmter zeitlicher Stadien der S-Phase an definierten Orten im Zellkern. Bisher ist nicht verstanden, wie die räumlich-zeitliche Ordnung der Replikationsfoci während der S-Phase determiniert wird. Dieses Problem sollte untersucht werden. Daneben war ungeklärt, welchen dynamischen Reorganisationen die DNA während der Replikation unterliegt. Auch dieses Problem wurde während den Untersuchungen besonders berücksichtigt.

3.3.2.1 Die Dynamik der naszenten DNA-Synthese

Um die räumlichen und zeitlichen Interaktionen zwischen Replikationsfoci und der DNA zu analysieren, wurde zuerst die Synthese naszenter DNA an den Replikationsfoci untersucht. Die Replikationsfoci wurden für die Lebendzellmikroskopie auch hier mit dem GFP-PCNA Fusionsprotein (Leonhardt et al., 2000) markiert. HeLa S6 Zellen, die typische S-Phase Muster des Fusionsproteins zeigten, wurden mit Cy3-dUTP mikroinjiziert, welches in naszente DNA während der Replikation eingebaut wird (Zink et al., 1998). Nach der Mikroinjektion wurden die Zellen an das konfokale Laserscanning Mikroskop transferiert (die experimentelle Vorgehensweise ist in Abbildung 20 a

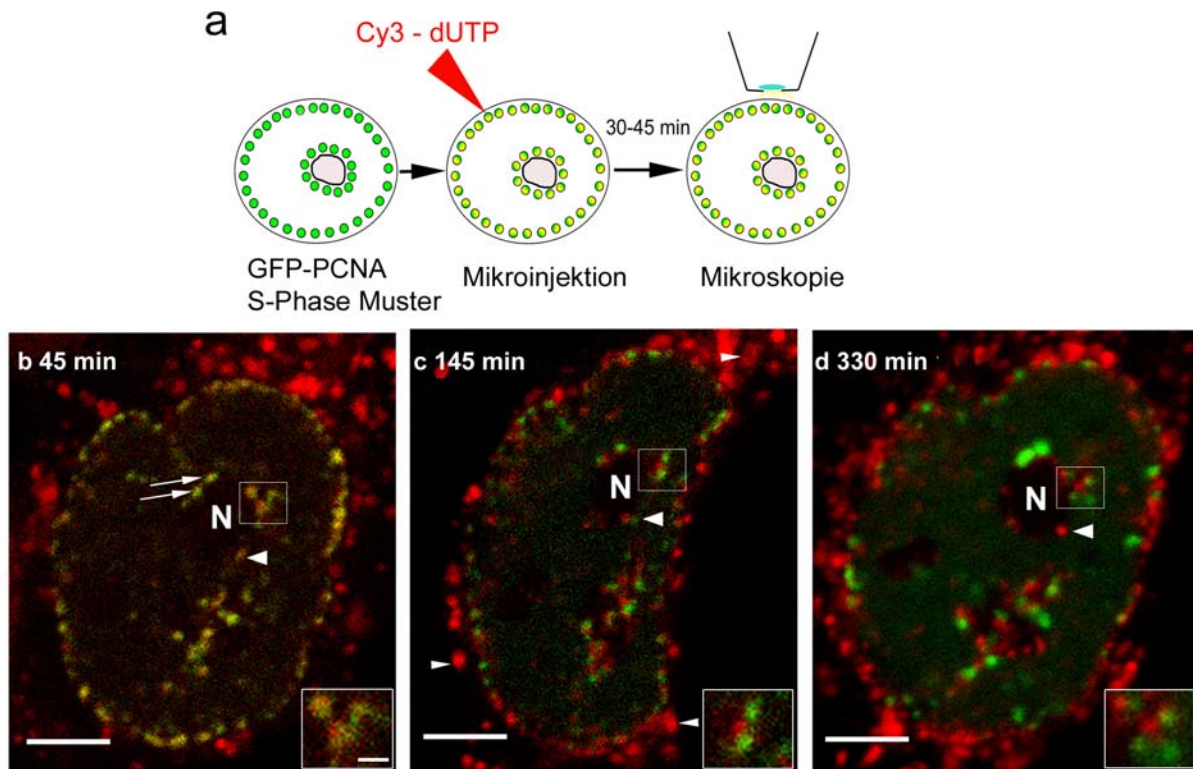


Abbildung 20

Naszente DNA-Synthese in einem doppelt-markierten Zellkern. (a) Markierungsschema. (b-d) Zeitserie (die Zeitpunkte sind in Minuten nach der Mikroinjektion angegeben), die einen doppelt markierten HeLa S6 Zellkern zeigt (GFP-PCNA: grün, Cy3: rot). Kolokalisierende Cy3- und GFP-Fluoreszenzen erscheinen gelb. Jede Abbildung zeigt eine Projektion von vier lichtoptischen Schnitten ($\Delta z = 600 \text{ nm}$). Das GFP-PCNA Muster schreitet von einem mittleren (45 min) zu einem späten S-Phase Muster (330 min) fort. Nach anfänglicher Kolokalisation von naszenter DNA mit GFP-PCNA-Foci (45 min), erscheinen GFP-PCNA-Foci an Orten benachbart zu naszenter DNA zum Zeitpunkt 145 min und dann an weiter entfernten Orten während des Fortschreitens der S-Phase (siehe auch die Vergrößerungen der eingezeichneten Regionen, Maßstab: $1 \mu\text{m}$). Die große Pfeilspitze deutet auf eine Region, wo GFP-PCNA-Foci nach der DNA-Synthese verschwanden. Zwei Replikationsstellen (kleine Pfeile) an der nukleolären (N) Peripherie sind in Abbildung 21 vergrößert gezeigt. Kleine Pfeilspitzen zeigen auf Cy3-markierte zytoplasmatische Vesikel. Maßstab: $5 \mu\text{m}$.

skizziert). Weil es einige Zeit in Anspruch nahm, die Zellen in die Lebendzellkammer einzuspannen und die Einstellungen am Mikroskop zu optimieren, wurde mit den Aufnahmen der Zeitserien circa 30 min bis 45 min nach der Mikroinjektion begonnen. In allen Fällen wurden Serien lichtoptischer Schnitte der Kerne aufgenommen, so dass für jeden Kern und jeden Zeitpunkt die dreidimensionale Information erhältlich war.

Die Abbildung 20 b-d zeigt einen HeLa S6 Zellkern, der über einen Zeitraum von 330 min nach der Mikroinjektion aufgenommen wurde. 45 min nach der Mikroinjektion zeigte dieser Zellkern ein Muster, das typisch ist für die mittlere S-Phase (Leonhardt et al., 2000; O'Keefe et al., 1992; Sadoni et al., 1999) mit vielen markierten Replikationsfoci, die an den nukleären und nukleolären Peripherien konzentriert vorlagen. Zu diesem Zeitpunkt kolokalisierten die GFP- und Cy3-markierten Foci (Abbildung 20 b), was die Synthese von naszenter DNA an GFP-markierten Foci zeigte. Die nachfolgenden Zeitpunkte (Abbildung 20 c und d) zeigten Muster von GFP-PCNA, die typisch für spätere Stadien der S-Phase sind, mit zunehmend weniger und größeren Replikationsfoci (Leonhardt et al., 2000; Nakayasu und Berezney, 1989; Sadoni et al., 1999). Die Synthese

von naszenter DNA an GFP-markierten Foci, sowie das normale Durchlaufen der typischen S-Phasen-Muster zeigten an, dass die markierten Replikationsfoci funktionsfähig waren. Des weiteren zeigten diese Daten, dass die Replikationsfoci ein normales räumlich-zeitliches Verhalten während der Aufnahmen zeigten.

Während des Fortschreitens der S-Phase wurde beobachtet, dass sich die mit GFP markierten Foci und die neu synthetisierte DNA trennten. Dies wurde dadurch deutlich, dass zu den späteren Zeitpunkten (Abbildung 20 c und d, 145 min und 330 min) weitaus weniger GFP- und Cy3-markierte Foci kolokalisierten als zu Beginn der Aufnahmen (Abbildung 20 b). Der Vergleich von Cy3- und GFP-markierten Mustern offenbarte, dass GFP-PCNA Foci während des Fortschreitens der S-Phase an Positionen benachbart zu Stellen der vorherigen DNA Synthese erschienen (Abbildung 20 b und c). Ebenso waren Orte erkennbar, an denen GFP-PCNA Foci während des Beobachtungszeitraumes wieder verschwanden (siehe große Pfeilspitze in Abbildung 20). An dieser Stelle sollte kurz angemerkt werden, dass keine zunehmenden Mengen von markierter naszenter DNA während des Fortschreitens durch die S-Phase produziert wurden, da der nukleäre Pool von markierten Nukleotiden ungefähr 1,5 h nach der Mikroinjektion aufgebraucht ist. Grund dafür ist der stabile Einbau von markierten Nukleotiden in zytoplasmatische Vesikel (Pfeilspitzen in Abbildung 20 c).

Um quantitativ abschätzen zu können, welcher Prozentsatz von GFP-markierten Foci in der Nähe von zuvor replizierten DNA-Foci während des Fortschreitens der S-Phase erschienen, wurden 913 zufällig ausgewählte GFP-markierte Foci in doppelt markierten Kernen (GFP-PCNA und Cy3) 90 Minuten nach Mikroinjektion analysiert. Da ein gegebener Replikationsort circa 45-60 Minuten aktiv ist (Ma et al., 1998; Manders et al., 1992; Manders et al., 1996), würde man erwarten, dass während dieser Zeitspanne von 90 Minuten die meisten Foci, die zu Beginn der Beobachtung aktiv Cy3-dUTP eingebaut haben, die Replikation beendet haben. Zum Zeitpunkt 90 Minuten sollte dann die Initiation an neuen Orten stattgefunden haben. Die Daten zeigten, dass 90 Minuten nach der Mikroinjektion $93,6\% \pm 2,4\%$ der GFP-markierten Foci an Orten vorlagen, die weniger als $1\text{ }\mu\text{m}$ von den Cy3-markierten DNA-Foci entfernt lagen. Diese Ergebnisse bekräftigten den visuellen Eindruck (vergleiche Abbildungen 20 und 21), dass neue GFP-markierte Foci fast immer in Abständen von weniger als $1\text{ }\mu\text{m}$ von zuvor replizierenden Stellen erschienen.

Für eine genauere Bewertung der dynamischen Interaktionen zwischen GFP-PCNA markierten Foci und naszenter DNA wurden einzelne Replikationsorte analysiert, die mit der nukleolären Peripherie assoziierten. Hier konnte die relative Lokalisation der markierten Strukturen in Hinblick auf die nukleoläre Peripherie bestimmt werden, wodurch es möglich wurde, nicht nur die relative Dynamik von Replikationsfoci und DNA zueinander zu untersuchen. Für die Analyse der kleinräumigen Dynamiken wurden solche ausgewählt, die in der x,y-Ebene stattfanden, da hier die mikroskopische Auflösung optimal ist, und keine bevorzugte Richtungen für Umlagerungen beobachtet wurde. Jedoch wurden in allen Fällen die lichtoptischen Schnitte über und unter den analysierten Foci untersucht (Beispiele sind Abbildung 22 c gezeigt), um Beiträge von benachbarten Foci in anderen nukleären Ebenen, sowie mögliche Bewegungen in z-Richtung auszuschließen.

Zwei Replikationsorte, die in Abbildung 20 mit kleinen Pfeilen markiert sind, sind im Detail in Abbildung 21 nochmals gezeigt. Bis 70 min nach der Mikroinjektion kolokalisierte die naszente DNA an diesen zwei Orten mit GFP-PCNA-Foci. 95 min nach der Mikroinjektion erschien jedoch ein Teil der naszenten DNA zwischen den zwei GFP-markierten Foci (Abbildung 21, 95 min, Überlagerung, Pfeil). Zum Zeitpunkt 120 min reorgani-

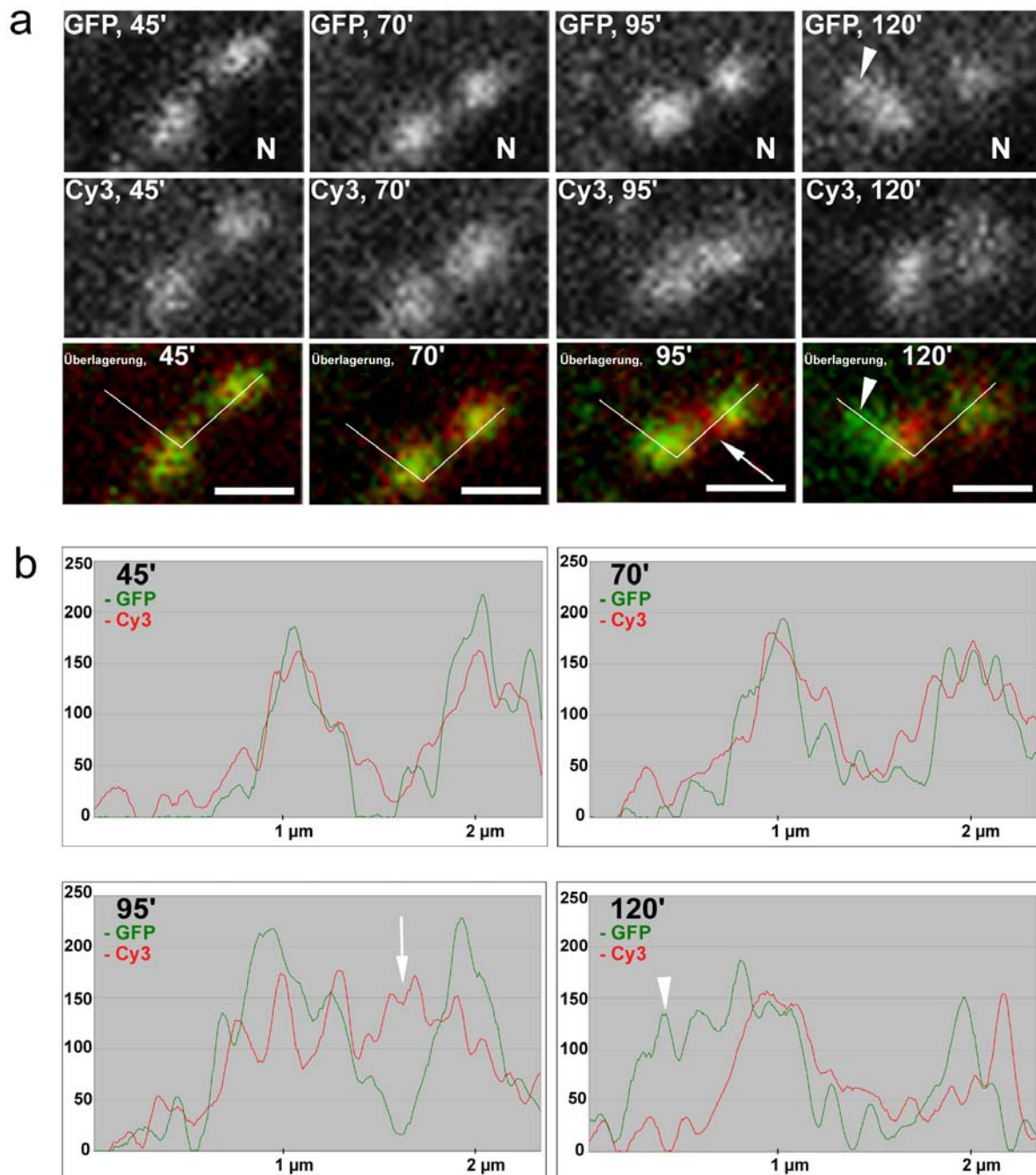


Abbildung 21

Lokale Dynamiken von zwei Replikationsorten. Die Abbildungen in (a) zeigen Vergrößerungen von zwei Replikationsorten (markiert mit kleinen Pfeilen in Abbildung 20), die mit der nukleolären (N) Peripherie assoziierten. Die Abbildungen zeigen die GFP- und die Cy3-Fluoreszenzen alleine (GFP: grün, Cy3: rot) sowie die dazugehörigen Überlagerungen (Kokalisation: gelb). Bei den Zeitpunkten 45 min und 70 min kolokalisieren nascente DNA und GFP-markierte Foci. Beim Zeitpunkt 95 min lag ein Teil der naszenten DNA, die an den beiden GFP-markierten Foci synthetisiert worden war, zwischen diesen beiden Foci (Pfeil). Zum Zeitpunkt 120 min erschien eine intensive GFP-Fluoreszenz an einer benachbarten Stelle, die zuvor keine großen Mengen an GFP-PCNA beinhaltetete (Pfeilspitze). Diese Stelle lag direkt benachbart zu der Stelle, an der zuvor DNA synthetisiert worden war, wo die nascente DNA mit der nukleolären Peripherie assoziiert blieb. (b) zeigt Fluoreszenzintensitätsprofile entlang einer Linie, die in den Überlagerungen in (a) angezeigt ist. Pfeil und Pfeilspitze deuten auf die gleichen Regionen wie in (a). X-Achse: Abstand in μ m; Y-Achse: Fluoreszenzintensitäten; Maßstab: 1 μ m.

sierte sich die naszente DNA wieder in zwei klar getrennte Foci (vergleiche Abbildung 21 a, 120 min, Cy3-Signal), die mit der nukleolären Peripherie assoziierten, wo sie für den Rest der Aufnahmen blieben (Abbildung 20).

Diese Ergebnisse zeigten, dass naszente DNA einigen Umordnungen unterlag, die jedoch lokal begrenzt innerhalb einer Größenordnung von 1 μm waren, und die nicht zu einer Umverteilung von naszenter DNA zu anderen, weiter entfernten nukleären Stellen führten. Wie Abbildung 20 b-d zeigte, blieb auch auf der Ebene des gesamten Kerns die neu synthetisierte DNA während des Fortschreitens der S-Phase mit den Kernorten assoziiert, wo sie synthetisiert worden war.

Was die Dynamik der GFP-PCNA-Foci betrifft, blieben die Foci, die in Abbildung 21 in Detail gezeigt sind, getrennt und assoziiert mit der nukleolären Peripherie bis 95 min nach der Mikroinjektion. Nach 120 min erschienen jedoch substantielle Mengen GFP-PCNA an einer eng benachbarten Stelle (Abbildung 21 a, 120 min, Pfeilspitze). Diese GFP-Fluoreszenz erschien, konsistent mit den anderen Daten, in einem Abstand von weniger als 1 μm von dem Ort der vorangegangenen DNA-Synthese, wo die DNA mit der nukleolären Peripherie assoziiert blieb.

Ähnliche Vorgänge wurden auch in anderen Kernen beobachtet (Abbildung 22). Abbildung 22 zeigt einen Kern, der entsprechend dem Schema in Abbildung 20 a markiert worden war. Er befand sich im gleichen S-Phase Stadium wie der in Abbildung 20 gezeigte Kern. Auch hier waren die Replikationsorte an den nukleären und nukleolären Peripherien lokalisiert.

Abbildung 22 a zeigt eine Zeitserie von Replikationsorten, die sich an der nukleolären Peripherie befanden. Zum Zeitpunkt 32 min nach der Mikroinjektion zeigten die Cy3- und GFP-markierten Foci einen hohen Grad an Kolokalisation. Zum Zeitpunkt 58 min überlagerten sich die mit GFP-PCNA- und Cy3-markierten Foci nach wie vor, es erschien aber zusätzlich naszente DNA neben einem mit GFP markierten Fokus. Da die naszente DNA ursprünglich an der nukleolären Peripherie synthetisiert worden war, mit welcher der GFP-markierte Fokus nach wie vor assoziiert war, zeigen auch diese Daten, dass lokale Umlagerungen der naszenten DNA stattfanden. Zum Zeitpunkt 82 min nach der Mikroinjektion hatte es eine weitere Umlagerung der DNA gegeben, die jetzt wieder enger mit der nukleolären Peripherie assoziiert war.

Auch das Erscheinen von GFP-markierten Foci an Orten mit Distanzen von weniger als 1 μm zu Orten, an denen zu vorangegangenen Zeitpunkten DNA synthetisiert wurde, konnte hier beobachtet werden. Zum Zeitpunkt 58 min tauchte ein relativ kleiner GFP-markierter Fokus (kleine Pfeilspitze in Abbildung 22 a) linkerhand von der Region 1 auf. An Region 1 befand sich schon ein GFP-markierter Fokus, der aktiv naszente DNA synthetisierte, wie die Cy3-Fluoreszenz zeigte.

Auch zum Zeitpunkt 82 min waren beide GFP-markierten Foci in der Region 1 vorhanden (siehe kleine und große Pfeilspitze in Abbildung 22 a). Der Fokus linkerhand (kleine Pfeilspitze) zeigte jetzt eine sehr intensive GFP-Fluoreszenz und kolokalisierte mit einer substantiellen Menge von markierter DNA. Dieses zeigte auch das entsprechende Fluoreszenzintensitätsprofil in Abbildung 22 b. Auch der rechte Fokus der Region 1 kolokalisierte mit einer beträchtlichen Menge von markierter DNA zum Zeitpunkt 82 min, jedoch war die Fluoreszenzintensität dieses rechten GFP-markierten Fokus jetzt relativ schwach. Insgesamt legten die Ergebnisse nahe, dass zuerst am rechten GFP-markierten Fokus DNA repliziert wurde. Als die Syntheseaktivität (angezeigt durch die Fluoreszenzabnahme des rechten GFP-markierten Fokus) hier abnahm, erschien in enger Nachbarschaft ($< 1 \mu\text{m}$) ein neuer GFP-markierter Fokus, der begann, an dieser Stelle DNA zu synthetisieren.

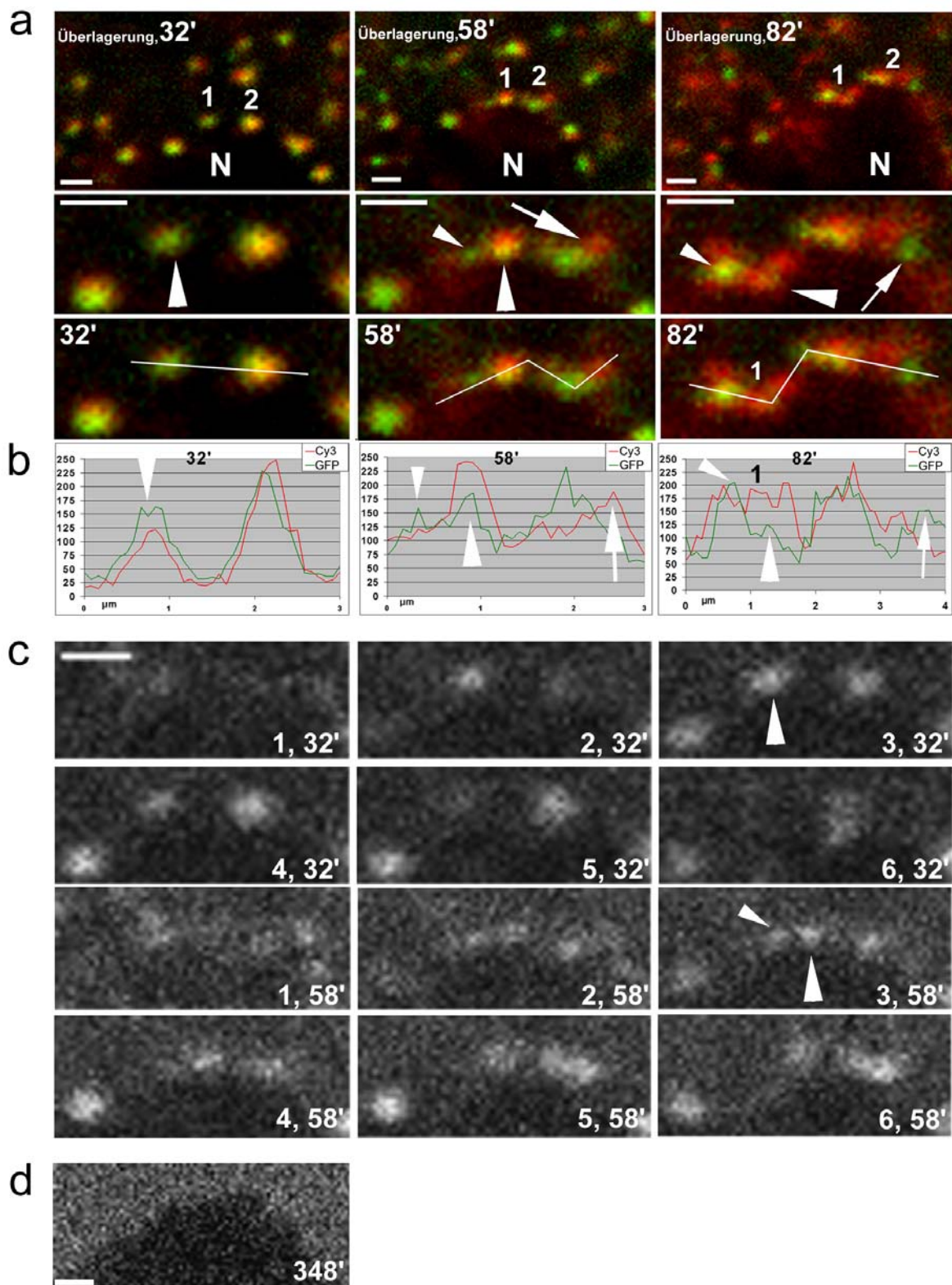


Abbildung 22

Lokale Umlagerungen von GFP-PCNA-Foci und naszenter DNA während der DNA Synthese. Der Kern war entsprechend dem Markierungsschema in Abbildung 20 a markiert worden. (a) zeigt eine Zeitserie (Zeitpunkte sind in Minuten nach der Mikroinjektion angegeben) einer perinukleolären Region. Der Nukleolus erscheint dunkel und ist mit einem N markiert. Es sind Projektionen von vier aufeinanderfolgenden lichtoptischen Schnitten ($\Delta z = 300$ nm) für jeden Zeitpunkt dargestellt. Die Überlagerungen der GFP- (grün) und Cy3-Fluoreszenzen (rot) sind gezeigt (Kokalisation: gelb). Die oberen drei Abbildungen zeigen den gesamten Bereich, während die Vergrößerungen von zwei Regionen naszenter

DNA-Synthese (mit 1 und 2 markiert) in den darunter liegenden sechs Abbildungen gezeigt sind. Eine große Pfeilspitze zeigt die erste Stelle der Synthese in Region 1. Eine kleine Pfeilspitze deutet auf einen GFP-markierten Focus, der in enger Nachbarschaft zu dieser Stelle zum ersten Mal zum Zeitpunkt 58 min auftauchte. Naszente DNA, die vom Ort ihrer Synthese an dem nukleolären Rand zum Zeitpunkt 58 min in Region 2 wegverlagert war, ist mit einem großen Pfeil markiert (der GFP-markierte Focus blieb hier mit der nukleolären Peripherie assoziiert). Naszente DNA breitete sich nur bis zu einem begrenzten Ausmaß aus und ließ Regionen ohne naszente DNA zwischen benachbarten Stellen der DNA-Synthese zurück. Ein kleiner Pfeil deutet auf einen GFP-markierten Fokus, der zum Zeitpunkt 82 min in einer solchen DNA-freien Region erschien. In (b) sind Fluoreszenzintensitätsprofile entlang der in (a) angezeigten Linie gezeigt (Pfeilspitzen und Pfeile deuten auf die gleichen Regionen wie in (a); X-Achse: Abstand in μm ; Y-Achse: Fluoreszenzintensitäten). In (c) sind aufeinanderfolgende lichtoptische Schnitte (GFP-Fluoreszenz, konfokale Rohdaten, $\Delta z = 300 \text{ nm}$) der vergrößerten Region zu den Zeitpunkten 32 min und 58 min gezeigt (Pfeilspitzen wie in (a und b)). Die lichtoptischen Schnitte zeigen, dass der neue GFP-markierte Focus, der links von der Stelle 1 zum Zeitpunkt 58 min erschien, nicht von einer anderen Kernebene dorthin wanderte. (d) zeigt einen lichtoptischen Schnitt des selben perinukleolären Bereichs zum Zeitpunkt 348 min nach der Mikroinjektion. Die diffuse GFP-Fluoreszenz zeigt an, dass die Zelle in die G2-Phase übergang. Maßstäbe: $1 \mu\text{m}$.

Dass das Auftauchen von GFP-PCNA in enger Nachbarschaft von Orten vorangegangener DNA-Synthese nicht spezifisch für die mittlere bis späte S-Phase war, konnte anhand von doppelt-markierten Zellen gezeigt werden, die ein frühes S-Phase Muster zeigten. In Abbildung 23 ist ein Zellkern gezeigt, der ein typisches frühes S-Phase Muster besaß. Zum Zeitpunkt 45 min war auch hier ein hoher Grad an Kolokalisation der GFP-markierten Foci mit der naszenten DNA zu erkennen. Dieser Grad an Kolokalisation nahm zum nächsten Zeitpunkt (70 min) ab. Auch hier tauchten in enger Nachbarschaft zu Orten vorangegangener DNA-Synthese GFP-markierte Foci auf. Ebenso zeigte sich auch an diesem Kern, dass die DNA keinen größeren Umlagerungen unterlag.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Analyse der Gesamtmuster sowie einzelner Replikationsorte zeigte, dass keine großräumigen Umlagerungen an der Synthese naszenter DNA beteiligt waren. Naszente DNA zeigte lokale Umordnungen, blieb aber mit den Orten ihrer Synthese assoziiert. GFP-PCNA-Foci erschienen an Orten, benachbart zu Orten vorangegangener DNA-Synthese während des Fortschreitens der S-Phase. Gleiche Beobachtungen wurden an weiteren 20 zufällig ausgewählten Kernen gemacht, die unterschiedliche Stadien der S-Phase repräsentierten, und Tausende von Replikationsorten beinhalteten. Die Analyse der Gesamtmuster, sowie von 60 zufällig ausgewählten Replikationsorten bestätigte die oben beschriebenen Ergebnisse.

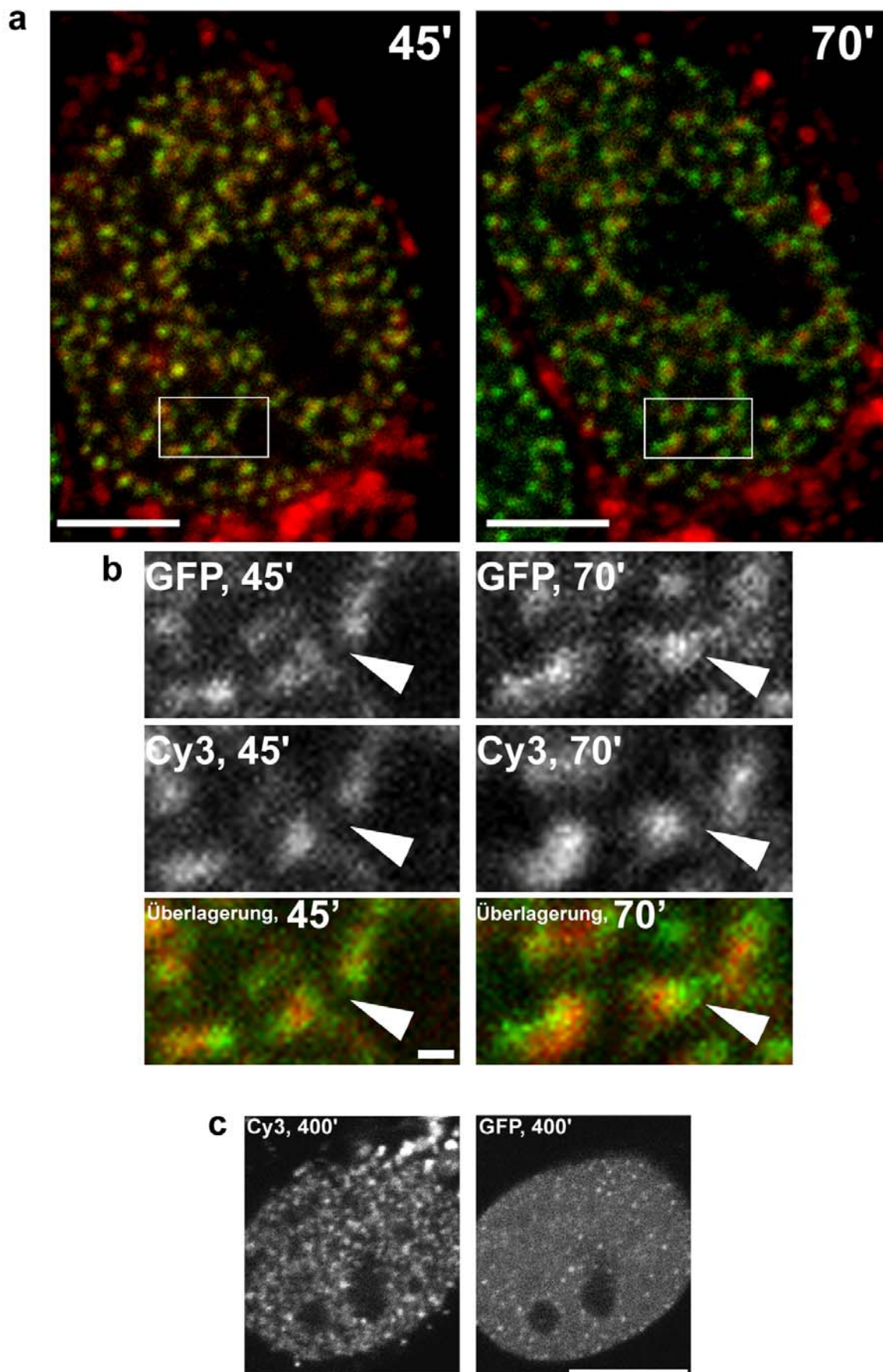


Abbildung 23

Dynamik der DNA-Replikation während der frühen S-Phase. Die Abbildung zeigt einen Kern, der entsprechend dem in Abbildung 20 a gezeigten Schema markiert worden war. Die Zeitpunkte sind in Mi-

nuten nach der Mikroinjektion (Cy3: rot; GFP: grün; Überlagerung: gelb) angegeben. Der Kern zeigte ein für die frühe S-Phase typisches Muster mit vielen Foci im Kerninneren. Die eingerahmten Regionen sind in (b) als Vergrößerungen gezeigt. Während die Cy3-markierte DNA keine größeren Umlagerungen während des Fortschreitens der S-Phase zeigte, erschienen GFP-PCNA-Foci an benachbarten Orten. Die Pfeilspitze deutet auf eine Region zwischen zwei Cy3-markierten Foci, die 45 min nach der Mikroinjektion mit GFP-PCNA-Foci kolokalisierten. Während diese Region zum Zeitpunkt 45 min keine GFP-Fluoreszenz zeigte, erschien ein GFP-markierter Fokus in dieser Region zum Zeitpunkt 70 min nach der Mikroinjektion. In (c) ist eine äquatoriale Ebene des Zellkerns zum Zeitpunkt 400 min nach Mikroinjektion abgebildet (der Kern hat sich um circa 100 Grad nach rechts gedreht). Während die mit Cy3-markierte DNA immer noch das typische frühe S-Phase Muster zu diesem späteren Zeitpunkt zeigte, spiegelt das GFP-Muster das normale Fortschreiten durch die S-Phase wider. Das diffus verteilte GFP-PCNA und die wenigen verbliebenen Foci zeigen den Übergang von der späten S-Phase nach G2 an. Maßstäbe: 5 μm in (a); 0,5 μm in (b) und 10 μm in (c).

3.3.2.2 Die Interaktion der Replikationsmaschinerie mit zu replizierender DNA

In einer weiteren Reihe von Experimenten sollte die Interaktion von GFP-markierten Replikationsfoci mit zu replizierender DNA untersucht werden. Für diesen Zweck wurde die DNA in der vorhergehenden S-Phase markiert. Wie bereits in der Einleitung beschrieben wurde, gibt es eine stabile Vererbung der Muster durch den Zellzyklus. Die markierten DNA-Foci „warten“ an bestimmten Kernorten auf die Replikation. Zur Markierung wurden HeLa S6 Zellen mit Mimosin in der frühen S-Phase synchronisiert, damit sie effizienter durch die Mikroinjektion markiert werden konnten. Vier Stunden nach Aufhebung des Mimosin-Blocks wurden die Zellen mit einer Mischung des GFP-PCNA Expressionsplasmids und Cy3-dUTP mikroinjiziert. Die mikroskopische Analyse der Zellen fand am nächsten Tag während der ersten S-Phase nach der Markierung statt (vergleiche Markierungsschema in Abbildung 24 a). In einigen Fällen wurde zusätzlich Cy5-dUTP 1,5 h nach der Mikroinjektion von Cy3-dUTP mikroinjiziert. Dieses Markierungsschema ergab Markierungsmuster, bei denen Cy3- und Cy5-markierte Foci sich teilweise überlagerten, aber anfangen, sich zu trennen (Anmerkung: freies Cy3-dUTP ist circa 1,5h nach der Mikroinjektion nicht mehr vorhanden, da es in zytoplasmatische Vesikel eingebaut wird, siehe Abbildung 20). Doppelte Pulsmarkierung mit Cy3- und Cy5-dUTP ermöglichte die Identifizierung von DNA mit einem aufeinanderfolgenden Replikationszeitpunkt in der Mutterzelle.

Um mögliche Artefakte zu vermeiden, wurde auf eine weitere Synchronisation der Zellen verzichtet. Wie zu erwarten war, waren die meisten markierten Zellen am nächsten Tag entweder nicht in der S-Phase (uniforme GFP-PCNA Verteilung im Nukleoplasma), oder in dem Stadium der S-Phase, das nicht dem Stadium entsprach, in dem die Mutterzelle markiert worden war. Das bedeutete, dass sich hier GFP-PCNA-Foci und markierte DNA in unterschiedlichen Regionen des Zellkerns befanden. Da jedoch die Interaktion zwischen GFP-PCNA markierten Foci und DNA-Foci untersucht werden sollte, beschränkten sich die Aufnahmen auf Zellen, in denen sich markierte DNA- und GFP-PCNA-Foci in gleichen Kernregionen befanden.

Die Zellen wurden entweder nach Formaldehydfixierung (Abbildung 25), oder lebend beobachtet (Abbildung 26 und 27). Das Auftreten von gleichen markierten Schwesterzellen (siehe Abbildung 26) zeigte ein normales Fortschreiten der doppelt- und dreifach-markierten Zellen durch den Zellzyklus und die Mitose. Auch hier wurden in allen Fällen lichtoptische Schnitte am konfokalen Laserscanning Mikroskop aufgenommen, um die räumliche Situation korrekt interpretieren zu können. Für jeden Kern wurde die Anzahl der Cy3- und GFP-markierten Foci bestimmt. Daneben wurde bestimmt, wie

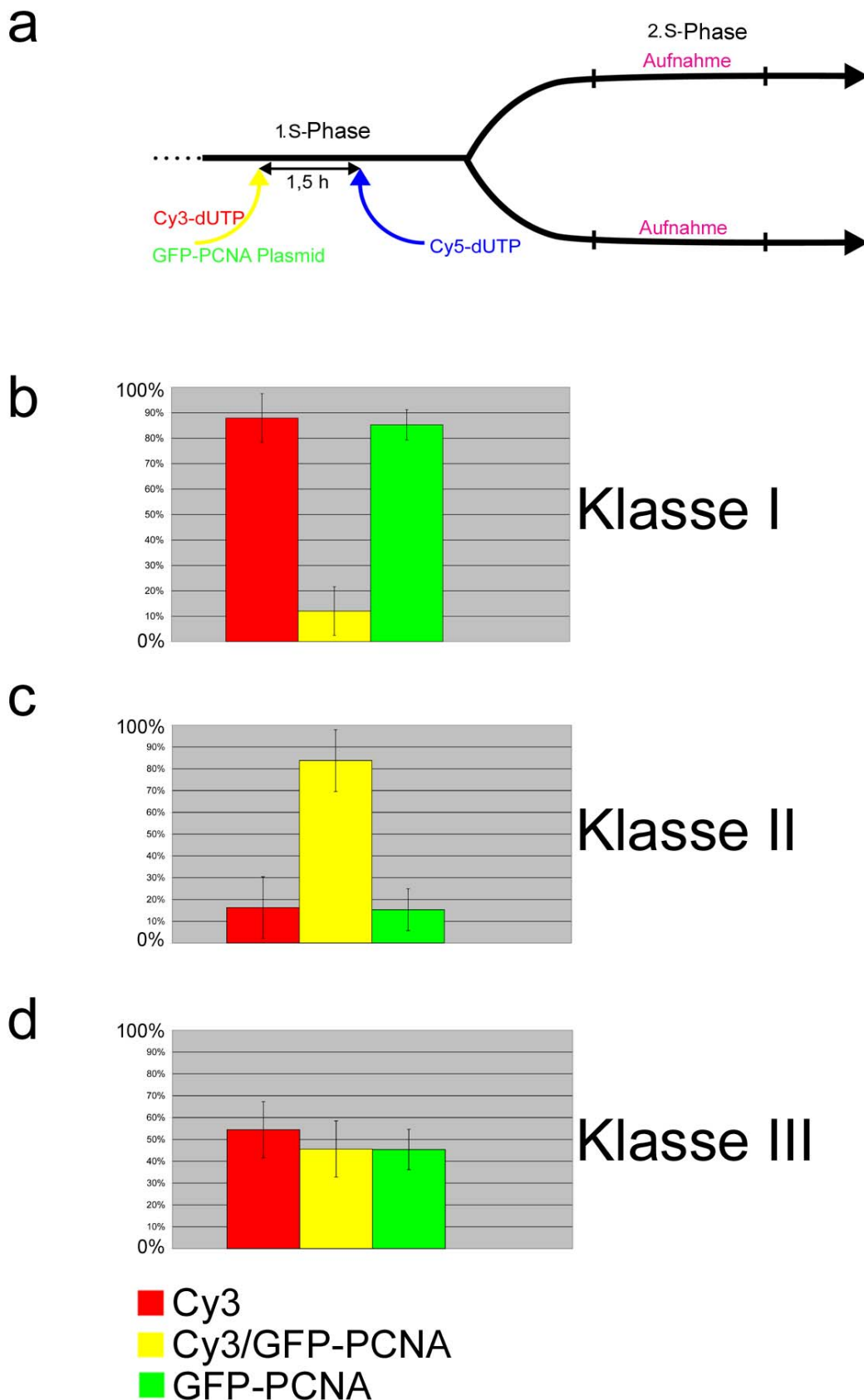


Abbildung 24

Kolokalisation von GFP-PCNA-Foci mit Cy3-markierten DNA-Foci, die in der Mutterzelle markiert worden waren. In (a) ist die experimentelle Vorgehensweise skizziert. Die Zellen wurden während der ersten S-Phase mit einer Mischung des GFP-PCNA Expressionsplasmids und Cy3-dUTP mikroinjiziert. 1,5 h später wurde ein Teil der Zellen mit Cy5-dUTP mikroinjiziert. Die Zellen wurden am nächsten Tag

während der folgenden S-Phase nach der Zellteilung beobachtet. In (b-d) sind die Ergebnisse der quantitativen Analyse bezüglich der Kolokalisation zwischen Cy3- und GFP-PCNA-Foci gezeigt (dazu wurden 21.872 Cy3-markierte und 17.401 GFP-markierte Foci ausgewertet). Die roten und gelben Balken stellen die Fraktionen der Cy3-markierten Foci dar, die in den Tochterzellen mit GFP-markierten Foci kolokalisierten (gelb) oder nicht kolokalisierten (rot). Die grünen Balken stellen die Fraktionen der GFP-markierten Foci dar, die nicht mit Cy3-markierten Foci kolokalisierten. Einzelne Kerne der Tochterzellen zeigten unterschiedliche Grade an Kolokalisation. In Klasse I Kernen (b) kolokalisierten im Schnitt nur circa 15 % der Cy3-markierten Foci mit GFP-markierten Foci. In Klasse II Kernen (c) kolokalisierten durchschnittlich circa 85 % der Cy3-markierten Foci mit GFP-markierten Foci. In Klasse III Kernen (d) kolokalisierten durchschnittlich ungefähr die Hälfte der Cy3-markierten Foci mit GFP-markierten Foci.

viele GFP- beziehungsweise Cy3-markierte Foci im jeweiligen Kern der Tochterzellen kolokalisierten (vergleiche auch Material und Methoden). Insgesamt wurden 21.872 Cy3-markierte Foci und 17.401 GFP-markierte Foci ausgewertet.

Es wurden unterschiedliche Grade an Kolokalisierung zwischen Cy3-markierten und GFP-markierten Foci in den individuellen Kernen der Tochterzellen beobachtet: In einem Drittel der Kerne war ein geringer Grad an Kolokalisation zu beobachten (Klasse I Kerne, Abbildung 24 b). Hier kolokalisierten im Durchschnitt nur circa 15 % der Cy3-markierten Foci mit GFP-PCNA-Foci und umgekehrt. Im Gegensatz dazu zeigte ein weiteres Drittel der untersuchten Kerne einen hohen Grad an Kolokalisation. In diesen Kernen kolokalisierten ungefähr 85 % der einzelnen Cy3- und GFP-markierten Foci miteinander (Klasse II Kerne, Abbildung 24 c). Beispiele für Klasse I und Klasse II Kerne sind in Abbildung 25 gezeigt. Ein dazwischenliegender Grad an Kolokalisation, der im Durchschnitt circa 50 % betrug, wurde in den übriggebliebenen letzten Drittel der Kerne beobachtet (Klasse III Kerne, Abbildung 24 d und Abbildung 27).

Ein auffallend hoher Grad an Kolokalisation wurde in einem Drittel der Kerne gefunden (85% in Klasse II Kernen). Diese Befunde wurden mit der erwarteten Wahrscheinlichkeit verglichen, dass dieser hohe Grad an Kolokalisation beobachtet werden würde, wenn GFP-PCNA markierte und DNA-markierte Foci rein zufällig die Kernregionen besetzen würden, die typisch für das jeweilige Stadium der S-Phase sind. Die entsprechenden Berechnungen wurden mit freundlicher Unterstützung von Dr. Ernst Stelzer, EMBL Heidelberg, durchgeführt. 50 % der Klasse II Kerne wurden während der zweiten Hälfte der S-Phase aufgenommen. Da in diesen Kernen klar voneinander getrennte, individuelle Foci unterschieden werden konnten, was in früheren S-Phasestadien sehr schwer ist, wurde die Analyse auf diese Kerne beschränkt.

Durchschnittlich wurden in der zweiten Hälfte der S-Phase circa 60 markierte DNA-Foci und circa 60 GFP-PCNA markierte Foci in einer gegebenen Kernebene beobachtet. Jede Klasse von Foci besetzte circa 10 % der relevanten Kernregionen, welches während der zweiten Hälfte der S-Phase hauptsächlich Regionen an den nukleären und nukleolären Peripherien mit einer Breite von ungefähr 1 μm waren.

Um die Wahrscheinlichkeit (p) für einen hohen Grad an Kolokalisation zu berechnen, wenn DNA-Foci und GFP-PCNA-Foci die nukleären und nukleolären Peripherien rein zufällig besetzen würden, wurden diese Regionen in Felder unterteilt, die durch DNA-Foci besetzt werden könnten. So wurden die nukleären und nukleolären Peripherien eines ellipsoiden Modellkerns (Länge: 20 μm , Breite: 10 μm), der 2 Nukleoli mit einem Durchmesser von 4 μm beinhaltete, in 600 Felder innerhalb einer gegebenen Kernebene unterteilt (durchschnittlich 60 DNA-Foci in einer gegebenen Kernebene, die circa 10% der relevanten Kernregion besetzten). Anschließend wurde die Wahrscheinlichkeit (p) berechnet, dass ein DNA-Fokus und ein GFP-PCNA-Fokus in einem gegebe-

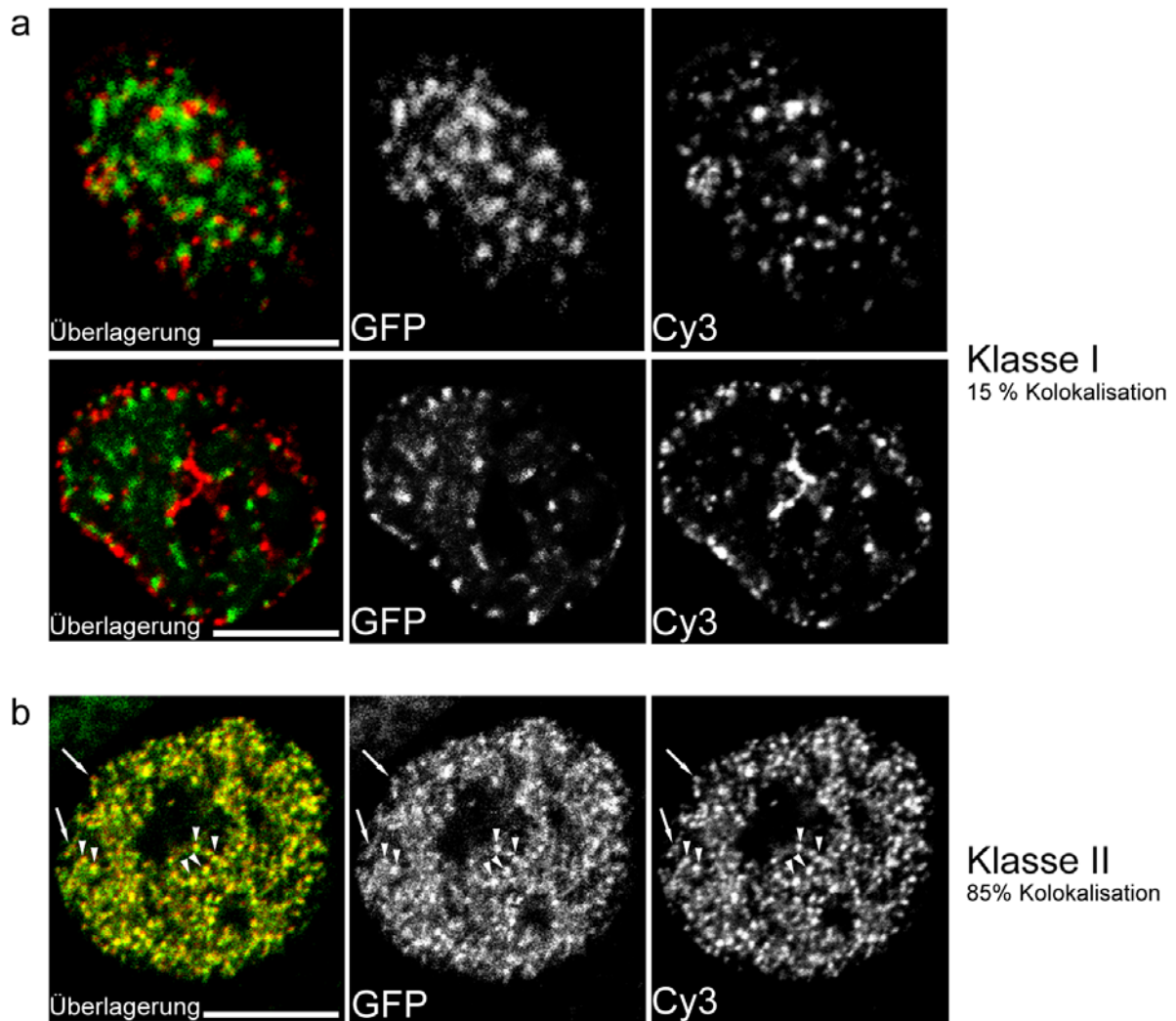


Abbildung 25

Räumliche Anordnungen der GFP-PCNA und Cy3-markierten Foci in Klasse I und Klasse II Kernen. Die Kerne wurden gemäß der in Abbildung 24 a dargestellten Vorgehensweise markiert. Die GFP- und Cy3-Fluoreszenzen und die dazugehörigen Überlagerungen (GFP: grün; Cy3: rot; Kolokalisation: gelb) sind gezeigt. In (a) sind einzelne lichtoptische Schnitte eines Klasse I Zellkerns gezeigt. Die obere Abbildungen zeigen die Kernperipherie, während die darunter liegenden Abbildungen eine mittlere Kernebene zeigen. In (b) sind lichtoptische Schnitte einer mittleren Kernebene eines Klasse II Zellkerns gezeigt. Der Kern zeigt ein für die frühe S-Phase typisches Muster mit vielen Foci, die das Kerninnere besetzen. Kolokalisation auf der Ebene einzelner Foci wird offensichtlich in Regionen mit weniger markierten Foci (Pfeile), sie kann aber auch in stärker besetzten Regionen beobachtet werden (Pfeilspitzen). Maßstäbe: 10µm.

nen Feld kolokalisierten. Dazu wurde folgende Binominalfunktion verwendet:

$$\binom{y}{n} * \binom{x-y}{y-n} / \binom{x}{y} = p(x, y, n)$$

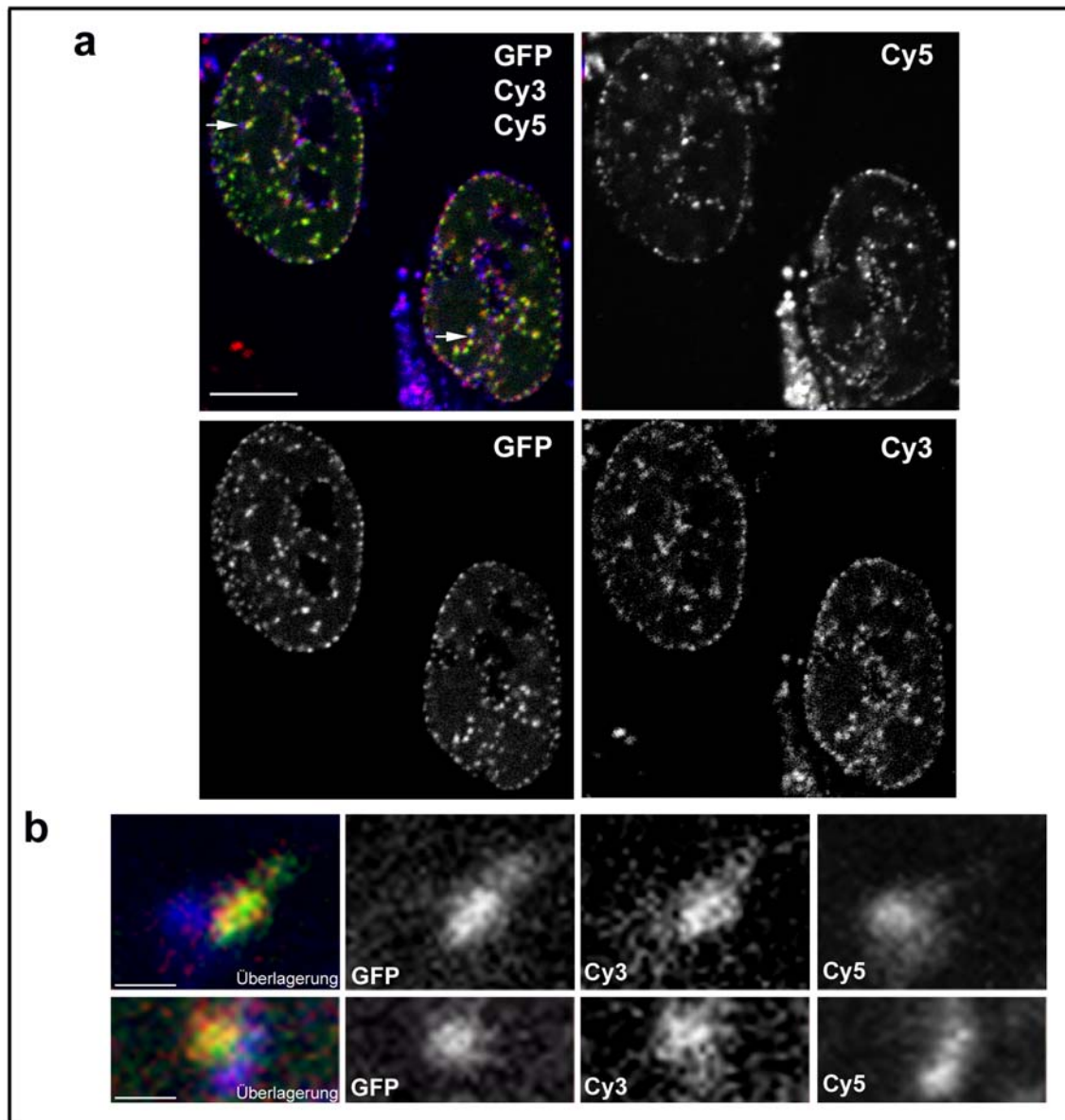


Abbildung 26

Zeitlich-räumliche Interaktionen der Replikationsmaschinerie mit benachbarten Gruppen von DNA-Foci. (a) Die Abbildungen zeigen lichtoptische Schnitte der mittleren Ebenen von Kernen zweier Schwesterzellen, die gemäß dem Schema in Abbildung 24 a markiert worden waren. Die Pfeile deuten auf Regionen mit markierten Foci, die in (b) vergrößert dargestellt sind. Die Abbildungen zeigen die einzelnen GFP-, Cy3- und Cy5-Fluoreszenzen alleine oder die Überlagerungen wie angegeben (GFP: grün; Cy3: rot; Cy5: blau; Kolokalisation von rot und grün erscheint gelb, Kolokalisation von rot und blau erscheint violett, Kolokalisation aller drei Farben erscheint weiß). (b) GFP-markierte Foci kolokalisieren mit Cy3- aber nicht mit benachbarten Cy5-markierten Foci. Maßstäbe: 10 μm in (a) und 1 μm in (b).

wobei x die Anzahl der Felder, y die Anzahl der von DNA-Foci besetzten Felder (10 %) und n die Anzahl der Felder, die von einem DNA-Fokus und einem GFP-PCNA-Fokus (Kolokalisation) besetzt sind, repräsentiert.

Die entsprechenden Berechnungen ergaben einen Wert von 10^{-50} für die Wahrscheinlichkeit, dass 85 % der DNA- und GFP-PCNA-Foci unter diesen Bedingungen miteinander kolokalisieren. Dieses Ergebnis wurde unter der Annahme erhalten, dass an jedem Fokus 80 % der Pixel der Cy3- und GFP-markierten Foci kolokalisieren. In Wirklichkeit wurde oft ein höherer Grad an Kolokalisation beobachtet (siehe Abbil-

dung 26). In Anbetracht dieses höheren Grades an Kolokalisation würde die erwartete Wahrscheinlichkeit sogar noch niedriger als 10^{-50} sein. Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass der beobachtete hohe Grad an Kolokalisation in einem Drittel der Kerne mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht auf zufällige Besetzung gleicher Kernorte durch unterschiedliche Foci zurückzuführen ist.

Da es schwer ist, individuelle Foci während früherer S-Phasestadien zu zählen, wurde auf eine Wahrscheinlichkeitsberechnung in diesen Kernen verzichtet. Die visuelle Inspektion offenbarte jedoch, dass in diesen Kernen DNA-Foci und GFP-PCNA auf der Ebene individueller Foci genau miteinander kolokalisierten (siehe Abbildung 25 b). Diese Befunde zeigten, dass auch in diesen Kernen keine zufälligen Kolokalisationsmuster beobachtet wurden.

Der beobachtete hohe Kolokalisationsgrad von GFP- und Cy3-markierten Foci in Klasse II Kernen (85 % Kolokalisation) legte auch nahe, dass DNA-Foci, die zusammen zu einem bestimmten Zeitpunkt während der S-Phase in der Mutterzelle replizierten (deshalb zusammen mit Cy3 markiert), wieder synchron in den Tochterzellen replizierten (85 % durch GFP-PCNA-Foci besetzt). Dieses implizierte, dass 85 % der DNA-Foci ihren Replikationszeitpunkt stabil von S-Phase zu S-Phase beibehielten. Vor diesem Hintergrund stellte sich die Frage, warum dieser hohe Grad an Kolokalisation nur in einem Drittel der Kerne beobachtet wurde.

Die Ergebnisse, die auf Beobachtungen naszenter DNA-Synthese basierten (siehe oben, 3.3.2.1), zeigten, dass während des zeitlichen Fortschreitens der S-Phase GFP-PCNA-Foci an Orten benachbart zu vorangegangenen Orten der DNA-Synthese erschienen. Wenn man also das zeitliche Fortschreiten in der S-Phase berücksichtigt, würde man erwarten, dass GFP-PCNA-Foci zuerst Orte benachbart zu markierten DNA-Foci besetzen würden, dann synchron diese Foci replizieren würden (Klasse II Kerne, 85 % Kolokalisation), und dann wiederum eng benachbarte Orte besetzen würden. Unter diesen Gegebenheiten würde man erwarten, dass ein Drittel der Kerne zu den Klasse II Kernen gehören würde, während zwei Drittel der Kerne niedrigere Grade an Kolokalisation zeigen sollten. In diesen Kernen sollten die meisten GFP-PCNA-Foci nahe bei den markierten DNA-Foci liegen, aber nicht kolokalisieren. Die experimentellen Befunden stimmten mit diesen Vorhersagen überein. Visuelle Inspektionen von zwei Drittel der Kerne, die zur Klasse I (15% Kolokalisation) und Klasse III (50 % Kolokalisation) gehörten, offenbarten, dass dort tatsächlich GFP-PCNA-Foci beinahe immer Positionen nahe bei markierten DNA-Foci besetzten, in Fällen, wo sie nicht kolokalisierten (siehe Abbildungen 25 a und 27).

Um die Möglichkeit weiter zu untersuchen, dass die unterschiedlichen Klassen unterschiedliche zeitliche Stadien repräsentierten, wurden Klasse II Kerne analysiert, die zusätzlich noch mit Cy5-dUTP markiert waren (siehe Markierungsschema in Abbildung 24 a). Die Abbildung 26 zeigt zwei markierte Schwesterkerne, die beinahe synchron durch die S-Phase fortschritten (gleiche GFP-PCNA-Muster), und ähnliche Muster in der Cy3- und Cy5-Fluoreszenz zeigen. Letzterer Befund steht in Einklang mit der Tatsache, dass die Positionierung von DNA mit einem spezifischen Replikationszeitpunkt klonal vererbt wird (Ferreira et al., 1997; Sadoni et al., 1999). Die GFP- und Cy3-Fluoreszenzen zeigten beinahe identische und kolokalisierende Muster in diesen Kernen, was zeigte, dass die Cy3-markierten Foci in diesen Schwesterzellen synchron replizierten, ebenso wie in deren Mutterzelle. Eng benachbarte Foci, die in der Mutterzelle 1,5 h später mit Cy5-dUTP markiert worden waren, zeigten dagegen nur eine periphere Überlagerung mit den GFP/Cy3-markierten Replikationsfoci (siehe Vergrößerung in Abbildung 26 b).

Diese Ergebnisse zeigten, dass die unterschiedlichen Klassen der Muster, wie sie oben beschrieben sind, in der Tat die sequentielle Aktivierung von benachbarten Gruppen von DNA-Foci mit einem unterschiedlichen Replikationszeitpunkt widerspiegeln. Entsprechend gehören die in Abbildung 26 gezeigten Kerne zu Klasse II Kernen (hoher Grad an Kolokalisation) in Hinblick auf die früher replizierenden Cy3-markierten Foci, und zur Klasse I (niedriger Grad an Kolokalisation) im Hinblick auf die später replizierenden Cy5-markierten Foci. Die Tatsache, dass benachbarte Schwesterzellen beobachtet wurden, die recht synchron durch die S-Phase fortschritten (gleiches GFP-PCNA Muster) und ähnliche Kolokalisationsmuster zeigten, unterstreicht, dass die Kolokalisationsmuster im zeitlichen Kontext interpretiert werden müssen. Zusätzlich zeigt der Befund, dass getrennte Typen von DNA-Foci mit unterschiedlichen Kolokalisationsmustern vorlagen, dass die markierten DNA-Foci nicht nur eine hohe zeitliche Stabilität (85 % behalten ihren Replikationszeitpunkt von S-Phase zu S-Phase bei), sondern auch eine hohe strukturelle Stabilität besitzen.

Unter der Annahme, dass die beobachteten unterschiedlichen Grade an Kolokalisation wahrscheinlich unterschiedliche zeitlichen Stadien widerspiegeln, würde man erwarten, dass Klasse III Kerne (50 % Kolokalisation) einem Übergangsstadium zwischen Klasse II (85 % Kolokalisation) und Klasse I (15 % Kolokalisation) entsprechen. Daher wurden Kerne der Klasse III ausgewählt um direkt zu untersuchen, wie markierte DNA-Foci von der Replikationsmaschinerie besetzt wurden, oder von dieser „zurückgelassen“ wurden.

Abbildung 27 zeigt einen Klasse III Kern. Während zu Beginn der Zeitserie GFP-markierte Foci mit Cy3-markierten Foci kolokalisierten, nahm der Grad an Kolokalisation

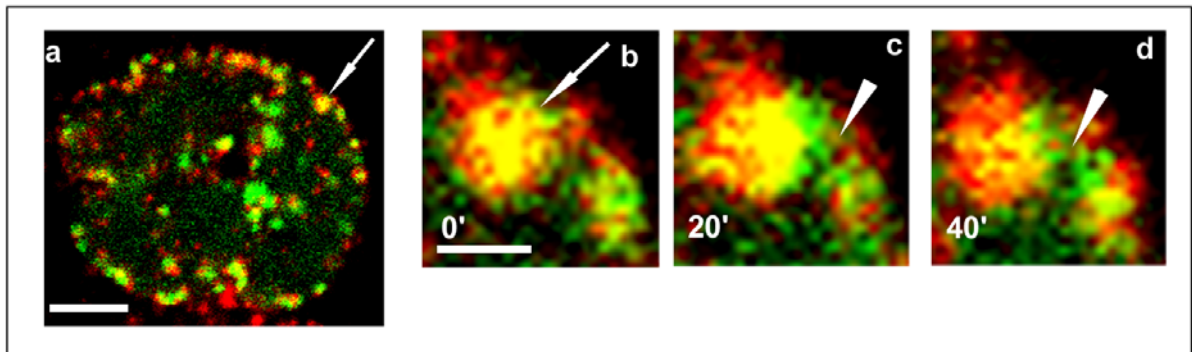


Abbildung 27

GFP-PCNA-Foci „verlassen“ markierte DNA und erscheinen an benachbarten Positionen in Klasse III Kernen. (a) Lichtoptischer Schnitt eines Klasse III Kerns zu Beginn der Zeitserie (Cy3-Fluoreszenz: rot; GFP-Fluoreszenz: grün; Kolokalisation: gelb; Maßstab: 5 µm). Der Pfeil deutet auf eine Region, die in (b-d) vergrößert dargestellt ist. Die Abbildungen (b-d) zeigen eine Zeitserie (Zeitpunkte sind in Minuten angegeben, Maßstab: 1 µm) einer Kernregion (durch Pfeil in (a) markiert). Der Pfeil in (b) deutet auf einen Cy3-markierten Fokus, der mit einem GFP-PCNA Fokus zu Beginn der Aufnahmen kolokalisierte. Zu späteren Zeitpunkten erschien die GFP-Fluoreszenz in einer benachbarten Region (Pfeilspitze) zwischen diesem und einem benachbarten Cy3-markierten Fokus.

in den darauffolgenden 40 Minuten ab. Das fokale DNA-Markierungsmuster blieb bemerkenswert stabil, während die GFP-Fluoreszenz in einer Cy3-markierten benachbarten Region zwischen zwei DNA-Foci erschien. Dieser Befund ist konsistent mit den anderen Ergebnissen dieser Arbeit, die gezeigt haben, dass DNA stabil posi-

tioniert bleibt, während GFP-PCNA Replikationsfoci an benachbarten Orten während des Fortschreitens der S-Phase erschienen. Zusätzlich untermauern diese Daten die Schlussfolgerungen der statistischen Analysen und zeigen direkt, dass unterschiedliche Kolokalisationsmuster den zeitlichen Verlauf der S-Phase widerspiegeln.

4. Diskussion

4.1 Die Lokalisation naszenter RNA im Zellkern

In der vorliegenden Arbeit wurde die Lokalisation naszenter RNA im Zellkern untersucht. Zu diesem Zweck wurden HeLa-Zellen, deren nukleosomale DNA stabil mit einem Histon H2B-GFP Fusionsprotein markiert war (Kanda et al., 1998), mit BrUTP mikroinjiziert. BrUTP wird in naszente RNA eingebaut (Wansink et al., 1993), circa 10 min nach der Mikroinjektion wurden die Zellen fixiert. Die topologischen Beziehungen zwischen dem GFP-markierten Chromatin und der markierten naszenten RNA, die durch eine Immunfärbung nachgewiesen wurde, wurde untersucht. Die durch konfokale Laserscanning Mikroskopie gewonnenen Bilddaten wurden durch eine hier entwickelte Auswertungsmethode analysiert, bei der mit verschiedenen Schwellenwerten eine Erosions- und Kollokalisationsanalyse durchgeführt wurde.

Entsprechend des Interchromatin-Kompartiment/Chromosomen-Territorien(IC/CT)-Modells (Cremer und Cremer, 2001) (Weiterentwicklung des „Interchromatin Domänen“ (ICD)-Modells) (Cremer et al., 1995; Cremer et al., 1993; Kurz et al., 1996; Zirbel et al., 1993) sollte die Synthese der naszenten RNA bevorzugt an der Oberfläche von Chromosomen-Territorien, beziehungsweise deren Subdomänen stattfinden. Die RNA sollte laut diesem Modell anschließend im sogenannten „Interchromosomen-Domänen(ICD)-Space“ vorliegen. Es wurde postuliert, dass der „ICD-Space“ funktionelle Enzymkomplexe enthält, und sich zwischen den Chromosomen-Territorien, beziehungsweise deren Subdomänen erstreckt. Dieser Raum sollte nur geringe Mengen an DNA enthalten (Cremer und Cremer, 2001).

In Bezug auf diese Vorhersage des IC/CT-Modells wurde in der vorliegenden Arbeit besonderes Gewicht auf die Frage gelegt, ob naszente RNA im Zellkern tatsächlich bevorzugt in chromatinarmen Bereichen lokalisiert. Die Ergebnisse zeigten keine bevorzugte Lokalisation der RNA in chromatinarmen Bereichen. Daher bestätigen die Ergebnisse nicht die entsprechenden Vorhersagen des IC/CT-Modells.

Es lässt sich mit den hier gewonnenen Daten nicht ausschließen, dass sich die RNA möglicherweise in chromatinarmen Räumen befindet, deren Durchmesser unterhalb der Auflösungsgrenze des Lichtmikroskops liegt. Bisher ist weitgehend unklar, welche Durchmesser die postulierten Kanäle des „ICD-Space“ haben sollten. Es ist auch schwierig, in Bezug auf die Fragestellung das höhere Auflösungsvermögen der Elektronenmikroskopie (EM) zu nutzen. Durch die für die EM nötigen Fixierungstechniken werden oft artifizielle chromatinarme Räume im Zellkern erzeugt, die sich so in lebenden oder Formaldehyd-fixierten Zellen nicht nachweisen lassen (Sadoni et al., 2001). Daher ist es mit der vorhandenen Methodik sehr schwierig, die Existenz eines Kanalsystems mit Kanälen mit sehr geringen Durchmessern zu beweisen, oder abzulehnen. Zumindest wurden aber in dieser Arbeit keine Hinweise dafür gefunden, dass sich die durch das IC/CT-Modell vorhergesagte Topologie auf der Ebene der Lichtmikroskopie nachweisen lässt.

Bei den in Abbildung 5 und 6 dargestellten Ergebnissen wird deutlich, dass es zumindest zwei chromatinarme Kompartimente innerhalb des Zellkerns gibt, die große Mengen an naszenter RNA enthalten. Diese sind Nukleoli und Speckles. Daneben zeigten die heterochromatischen Bereiche des Zellkerns relativ hohe Konzentrationen an DNA (durchschnittlich das 1,4-fache des Euchromatins (Sadoni et al., 2001), aber nur geringe Konzentrationen an naszenter RNA (siehe auch (Sadoni et al., 1999)). Dass in der vorliegenden Analyse bezüglich der naszenten RNA-Verteilung im gesam-

ten Zellkern trotzdem keine signifikant bevorzugte Lokalisation der naszenten RNA innerhalb chromatinarmer Bereiche gefunden wurde, deutet darauf hin, dass in den aktiv RNA synthetisierten euchromatischen Bereichen des Zellkerns die RNA bevorzugt mit Chromatin kolokalisiert.

Die hier gefundenen Ergebnisse stehen nicht im Einklang mit den Ergebnissen einer Studie von Politz et al. (1999), die nahe legen, dass mRNA innerhalb eines DNA-armen „Interchromatin-Raums“ lokalisiert. In dieser Studie wurde die DNA mit Hilfe des Farbstoffs Hoechst 33342 nachgewiesen. Ich konnte bereits zeigen, dass Farbstoffe wie DAPI oder Hoechst 33342 (Hoechst 33342 verhält sich ähnlich wie DAPI, (Crissman und Hirons, 1994)) die Organisation der DNA im Zellkern verzerrt widerspiegeln (Sadoni et al., 2001). Beide Farbstoffe haben eine hohe Affinität zu AT-reicher DNA. Daher erscheinen heterochromatische Bereiche, die vorwiegend AT-reiche DNA enthalten, stärker gefärbt, als es ihrem tatsächlichen DNA-Gehalt entspricht. Vergleiche mit H2B-GFP exprimierenden Zellen zeigten, dass euchromatische Bereiche, die relativ hohe Mengen an GC-reicher DNA (Sadoni et al., 1999) enthalten, in der DAPI-Färbung kaum oder gar nicht gefärbt erscheinen (Sadoni et al., 2001). Daher ist es möglich, dass die von Politz et al. (1999) beobachteten „Interchromatin-Räume“ in Hoechst 33342 gefärbten Zellkernen euchromatischen Regionen entsprechen, die substantielle Mengen an Chromatin enthalten. Wäre dies der Fall, so wären die Daten mit den Befunden der vorliegenden Arbeit vereinbar. Insgesamt zeigten die Befunde auch, wie wichtig es ist, zur Visualisierung des Chromatins angemessene Methoden zu benutzen. Die in der vorliegenden Arbeit benutzte Methodik zur Visualisierung des Chromatins mittels H2B-GFP scheint hierfür besonders geeignet zu sein (Kanda et al., 1998; Sadoni et al., 2001; Walter et al., 2003; Zink et al., 2003).

Eine 1999 veröffentlichte Studie (Verschure et al., 1999) benutzte zur Untersuchung der Frage, ob naszente RNA in chromatinarmen Bereichen des Zellkerns lokalisiert, eine ähnliche experimentelle Methodik, wie die in der vorliegenden Arbeit. Auch hier wurde naszente RNA mittels kurzer BrUTP-Pulse markiert, und das Chromatin wurde mittels H2B-GFP dargestellt. Zusätzlich wurden noch in einer weiteren Serie von Experimenten Chromosomen-Territorien mit Hilfe von „Painting“-Proben visualisiert. Trotz der vergleichbaren experimentellen Vorgehensweise kam diese Studie zu eklatant anderen Ergebnissen. Verschure et al. (1999) haben gefunden, dass naszente RNA bevorzugt in chromatinarmen Bereichen des Zellkerns lokalisiert.

Ein Unterschied zwischen der Vorgehensweise von Verschure et al. (1999) und der Vorgehensweise bei der Erstellung der vorliegenden Arbeit besteht in den angewandten Bildanalyseverfahren. Verschure et al. (1999) haben mit einem sogenannten Dekonvolutionsprogramm gearbeitet. Ziel bei der Anwendung von Dekonvolutionsverfahren ist es, durch die Mikroskopie bedingte Fehler bei der Abbildung von Lichtpunkten aus den mikroskopischen Bildern „herauszurechnen“. Zu diesem Zweck sind eine Reihe von unterschiedlichen Algorithmen entwickelt worden. Ein Problem ist, dass diese Algorithmen zu unterschiedlichen Artefakten führen können (Markham und Conchello, 2001). Diese sind auf mikroskopischen Bildern unter Umständen sehr schwer zu erkennen und zu kontrollieren, da es weitgehend unbekannt ist, wie die abgebildete Struktur wirklich aussieht.

Tatsache ist, dass die von unserer Arbeitsgruppe beschriebene Organisation von H2B-GFP markiertem Chromatin im Zellkern (Sadoni et al., 2001) deutlich von der Organisation von H2B-GFP markiertem Chromatin abweicht, wie sie von Verschure et al. (1999) nach Anwendung der Dekonvolution beschrieben wurde. Besonders fällt auf, dass die euchromatischen Bereiche auf den von Verschure et al. (1999) gezeigten Ab-

bildungen deutlich weniger Chromatin enthalten, als dies unseren Ergebnissen nach der Fall ist. Dies ist vor allem darauf zurückzuführen, dass der von Verschure et al. (1999) angewandte Algorithmus relativ schwache Fluoreszenzsignale eliminiert unter der Annahme, dass es sich hierbei nicht um echte Signale, sondern um Abbildungsartefakte handelt.

Da es in der Tat ein Problem, ist zu entscheiden, wo die Grenze zwischen relativ schwachen durch den Abbildungsprozess erzeugten Signalen und „echten“ Signalen ist, wurde hier für die Auswertung der Daten ein Verfahren entwickelt, bei dem die H2B-GFP Fluoreszenz durch progressiv ansteigende Schwellenwerte erodiert wurde. Nach jedem Erosionsschritt wurde die Kolokalisation mit der naszenten RNA gemessen. Bei diesem Verfahren ist es unerheblich, bei welchem Wert genau die Grenze zwischen schwachen, durch den Abbildungsprozess bedingten Fluoreszenzsignalen, und „echten“ Signalen liegt. Man sollte jedoch erwarten, dass ein deutlicher Abfall in der Kolokalisation zwischen der naszenten RNA und dem Chromatin zu verzeichnen ist, wenn diese Grenze im Erosionsprozess erreicht, beziehungsweise überschritten wurde, und die RNA tatsächlich vorwiegend in chromatinarmen Räumen lokalisiert sein sollte. An diesem Punkt sollten die relativ schwachen, durch den Abbildungsprozess bedingten Fluoreszenzsignale aus den Abbildungen eliminiert worden sein, so dass entsprechende Fluoreszenzsignale nicht mehr an Orten relativ geringer Chromatindichte zu verzeichnen sein sollten.

Ein möglicher Fehler ist, dass an diesem Punkt auch schon schwache, „echte“ Fluoreszenzsignale erodiert wurden. Das sollte jedoch zu einem noch stärkeren Abfall in dem Grad der Kolokalisation zwischen der naszenten RNA und dem Chromatin führen. Ein überproportionaler Abfall der Kolokalisation bei der zunehmenden Erosion der GFP-Fluoreszenz, wurde jedoch nicht beobachtet.

Einige bei der hier durchgeführten Analyse eventuell problematische Aspekte sollen hier noch kurz erläutert werden. Zum einem wurde hier nur ein Zelltyp benutzt, wobei es sich um eine stabile Krebszelllinie (HeLa-Zellen) handelte. Es kann also nicht ausgeschlossen werden, dass sich die RNA-Verteilung in normalen, primären Zelllinien anders verhalten würde. Allerdings scheint die RNA-Verteilung in, zum Beispiel weiblichen primären Fibroblasten nicht wesentlich anders zu sein, als in den hier untersuchten HeLa H2B-GFP Zellen (Verschure et al., 1999).

Ein weiterer Punkt ist, dass mit der hier durchgeführten RNA-Markierung die gesamte RNA des Zellkerns markiert wurde, die durch alle drei RNA-Polymerasen im Kern produziert wurde (Pombo et al., 1999). Daher wurde möglicherweise auch RNA markiert, die eventuell nicht weiter prozessiert wurde, und später degradiert wurde. Demzufolge kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass sich speziell die prozessierte RNA nicht doch bevorzugt an chromatinarmen Orten befand.

4.2 Die Interaktion von Speckles mit funktionell unterschiedlichen Chromatinfractionen

In der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion von Speckles mit funktionell unterschiedlichen Chromatinfractionen untersucht. Dafür wurden Speckles in lebenden CHO-Zellen mit Hilfe des eGFPdtra-Fusionsproteins markiert (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. M. C. Cardoso, MDC, Berlin), während funktionell unterschiedliche Chromatinfractionen mit Cy3-dUTP markiert wurden. Es zeigte sich, dass in den lebenden CHO-Zellen fast die gesamte früh-replizierende und transkriptionell

aktive DNA (bezüglich der Charakterisierung der funktionellen Eigenschaften von Chromatinfractionen mit definierten Replikationszeitpunkten siehe Sadoni et al., 1999) eng mit Speckles assoziiert war. Zum Gegensatz dazu fand sich keine enge Assoziation von Speckles mit spät-replizierender und transkriptionell inaktiver DNA.

Es ist bereits für einzelne Gene und in das Genom integrierte virale DNA gezeigt worden, dass sie im aktiven Zustand eng mit Speckles assoziieren, aber nicht im inaktiven Zustand (Misteli et al., 1997; Smith et al., 1999; Xing et al., 1995). Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, dass dies nicht nur für einzelne Gene zutrifft, sondern dass generell aktives Chromatin mit Speckles assoziiert, aber nicht inaktives Chromatin.

Die enge Assoziation von transkriptionell aktivem Chromatin mit Speckles schien direkt vom Prozess der Transkription abhängig zu sein. Nach der Inhibition der Transkription durch α -Amanitin wurde beobachtet, dass die enge Assoziation zwischen Speckles und transkriptionell aktivem Chromatin teilweise aufgehoben war. Die damit einhergehenden Änderungen in der Morphologie der Speckles standen im Einklang mit publizierten Daten (Misteli et al., 1997). Insgesamt stützten die Beobachtungen die Hypothese, dass Speckles Spleißfaktoren für die transkriptionell aktive DNA zur Verfügung stellen (Caceres et al., 1997; Eilbracht und Schmidt-Zachmann, 2001; Gama-Carvalho et al., 1997).

Die Tatsache, dass in enger Nachbarschaft von transkriptionell aktivem Chromatin Speckles zu finden waren, könnte mit dem Modell der Selbstorganisation erklärt werden (Misteli, 2001a). So könnte das transkriptionell aktive und früh-replizierende Chromatin die Orte der Specklesformierung determinieren. In diesem Fall wären genau definierte Orte im Zellkern zur Bildung der Speckles nicht notwendig. Analog zum Modell der Selbst-Assemblierung von Nukleoli (Dundr et al., 2000; Lewis und Tollervey, 2000; Misteli, 2001b) könnte hier auch über einen „Scanning-Mechanismus“ der Spleißfaktoren das „Auffinden“ von transkriptionell aktiven Chromatinbereichen stattfinden mit der anschließenden Bildung von Speckles durch Selbstorganisation.

Die visuelle Inspektion der Daten hatte nahe gelegt, dass früh-replizierende DNA nicht nur eng mit Speckles assoziiert war, sondern sich zum Teil sogar in Speckles befand. Diese Beobachtung war besonders interessant, da bisher davon ausgegangen wurde, dass sich keine DNA in Speckles befindet (Cremer und Cremer, 2001; Hendzel et al., 1998; Sadoni et al., 2001; Spector et al., 1991). Die Beobachtungen, dass sich speziell früh-replizierende DNA in den Speckles befand und die Lokalisation dieser DNA innerhalb der Speckles abhängig war vom Prozess der Transkription (weniger früh-replizierende DNA innerhalb von Speckles nach Inhibition der Transkription durch α -Amanitin), legten weiterhin nahe, dass es sich hier in der Tat um eine spezifische Interaktion von transkriptionell aktiver DNA mit Komponenten innerhalb der Speckles handelte.

Zur Kontrolle wurden Messungen der Cy3-Fluoreszenz innerhalb der Nukleoli vorgenommen. Auch in diesen schienen sich relativ hohe Mengen an früh-replizierender DNA zu befinden. Dieser Befund ließe sich damit erklären, dass auch rDNA, die sich in den Nukleoli befindet, früh-replizierend ist (Camargo und Cervenka, 1982; Dutrillaux et al., 1976; Kim et al., 1975). Allerdings wurde auch hier eine geringere Cy3-Fluoreszenz nach Behandlung mit α -Amanitin beobachtet. Dieser Effekt ist schwer zu erklären, da α -Amanitin bei den verwendeten Konzentrationen die in den Nukleoli aktive RNA-Polymerase I nicht inhibiert (Chambon, 1974). Vor dem Hintergrund dieser schwer zu interpretierenden Ergebnisse der Kontrollen ist der Befund, dass sich eine relativ intensive Cy3-Fluoreszenz nach Cy3-Markierung der früh-replizierenden DNA in den Speckles befand, die nach Behandlung der Zellen mit α -Amanitin abnahm, mit

größter Vorsicht zu bewerten.

In Bezug auf das verwendete Fusionsprotein war auffällig, dass es sich nicht nur stark in den Speckles, sondern auch in den Nukleoli anreichte. Hierbei könnten die beobachteten direkten Verbindungen zwischen Speckles und Nukleoli eine Rolle spielen (siehe Abbildung 14 und 15). Für einige Proteine ist bereits gezeigt worden, dass sie dynamisch zwischen Speckles und Nukleoli relokalisieren (Leung und Lamond, 2002). Allerdings findet normalerweise keine so starke Anreicherung dieser Proteine in den Nukleoli statt, und es gab bisher auch keine Hinweise dafür, dass dies über direkte Verbindungen zwischen Speckles und Nukleoli geschieht. Da das bisher auch nicht näher untersucht worden zu sein scheint, wäre es aufgrund der hier gemachten Beobachtungen interessant, der Frage nachzugehen, ob es tatsächlich auch in Abwesenheit von Fusionsproteinen direkte Verbindungen zwischen Nukleoli und Speckles gibt.

4.3 Organisation und Dynamik der DNA-Replikation

4.3.1 Die Dynamik der Replikationsmaschinerie

Im dritten Teil dieser Arbeit wurde die Dynamik der Replikationsmaschinerie und der DNA-Replikation untersucht. Zur Visualisierung der Replikationsmaschinerie wurden lebende HeLa S6-Zellen mit einem GFP-PCNA Expressionsplasmid (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. M. C. Cardoso, MDC, Berlin) entweder mikroinjiziert, oder transient transfiziert. PCNA ist ein zentraler Bestandteil der Replikationsmaschinerie. Es konnte bereits gezeigt werden, dass mit Hilfe des GFP-PCNA Fusionsproteins Replikationsfoci zuverlässig markiert werden können (Leonhardt et al., 2000). Zellen, die ein typisches S-Phase Muster von GFP-markierten Replikationsfoci zeigten, wurden am nächsten Tag über einen Zeitraum von circa 17 min in Zeitintervallen von 103s am konfokalen Laserscanningmikroskop aufgenommen. Zusätzlich wurden die Zellen noch unter Einfluss von Mimosin, das die Replikation inhibiert, beobachtet.

Die Auswertung der Zeitserien zeigte, dass sich Replikationsfoci innerhalb des Aufnahmezeitraums nur minimal bewegten. Die minimalen positionellen Schwankungen waren eher auf Änderungen der Kernmorphologie als auf den Replikationsprozess zurückzuführen, da vergleichbare positionelle Änderungen, sowohl bei aktiver Replikation, als auch bei Inhibition der Replikation durch Mimosin beobachtet werden konnten. Dies betraf vor allem Paare von Foci mit großen Distanzen, die mit der Kernperipherie assoziiert waren. Diese sollten auch erwartungsgemäß am stärksten von Änderungen der Kernmorphologie betroffen sein.

Die hier beobachtete positionelle Stabilität der Replikationsmaschinerie könnte durch verschiedene Mechanismen bedingt werden. Zum einen könnten die Replikationsfoci an eine immobile Struktur, wie zum Beispiel die Kernmatrix, binden (Berezney und Coffey, 1974; Berezney et al., 1995; Hozak et al., 1993; Zbarskii, 1948; Zbarskii und Debov, 1948). Zum anderen könnten diese großen Komplexe (bis zu einigen 100 nm Durchmesser) möglicherweise auch sterisch gehindert werden, ihre Positionen zu verlassen, bedingt durch den relativ dicht gepackten Kerninhalt. Daneben könnten die Proteinkomplexe auch durch Bindung an die DNA immobilisiert werden. Jüngste Studien haben gezeigt, dass auch die DNA im Säugerzellkern weitgehend positionell stabil ist (Chubb et al., 2002; Walter et al., 2003; Zink et al., 1998). Die Frage, wie die Replikationsfoci im Zellkern immobilisiert werden, bedarf der weiteren experimentellen Klärung.

4.3.2 Die Interaktion von DNA und der Replikationsmaschinerie

Wie oben beschrieben legten die experimentellen Befunde nahe, dass die Replikationsmaschinerie weitgehend immobil ist. Andere Studien legten nahe, dass auch die DNA im Zellkern weitgehend positionell stabil ist (Dimitrova und Gilbert, 1999; Ferreira et al., 1997; Manders et al., 1999; Sadoni et al., 1999; Zink et al., 1999; Zink et al., 1998). Damit ergab sich das Problem, wie der hoch dynamische Prozess der DNA-Replikation im Zellkern ablaufen kann, wenn beide beteiligten Partner weitgehend immobil sind. Um dieses Problem, sowie die zeitlich-räumliche Organisation der DNA-Replikation weiter zu untersuchen, wurde sowohl die Replikationsmaschinerie, als auch die replizierende DNA in lebenden Zellen markiert und untersucht. Die so erhaltenen Daten zeigten zum ersten Mal die Interaktion von DNA und der Replikationsmaschinerie in lebenden eukaryontischen Zellen.

Die Ergebnisse zeigten, dass die DNA während der Replikation in der Tat nur sehr begrenzte lokale Umlagerungen zeigt. Dagegen erscheint die Replikationsmaschinerie während des Fortschreitens der S-Phase immer an Orten, die eng benachbart sind zu Orten vorheriger DNA-Synthese. Diese Daten bezüglich der Dynamik der Replikationsmaschinerie stehen im Einklang mit jüngsten Ergebnissen, die durch „Photobleaching“-Experimente gewonnen wurden (Sporbert et al., 2002).

Die Daten stehen auch im Einklang mit früheren Ergebnissen, die durch Doppelpuls-Markierung von naszenter DNA gewonnen wurden (Ma et al., 1998; Manders et al., 1992; Manders et al., 1996). Diese Arbeiten, die mit fixierten Zellen durchgeführt wurden, konnten jedoch nicht klären, ob DNA in benachbarte Regionen des Zellkerns gespult wird, oder ob die Replikationsmaschinerie während des Fortschreitens der S-Phase an benachbarten Orten erscheint. Tatsächlich haben frühere Untersuchungen, die mit fixierten Zellen durchgeführt wurden, eher nahe gelegt, dass ein Spulen von naszenter DNA in benachbarte Kernregionen über die Grenzen eines Replikationsfokus hinaus stattfindet (Hozak et al., 1993). Auch eine kürzlich mit fixierten Zellen durchgeführte Untersuchung, welche die Trennung von naszenter DNA und Replikationsfoci untersuchte, konnte nicht klarstellen, welche lokalen Dynamiken in diesen Prozess involviert waren (Somanathan et al., 2001). Die hier gewonnenen Daten zeigen zum ersten Mal direkt, dass DNA während der Replikation positionell stabil bleibt, während die Replikationsmaschinerie ihre Position verändert und an benachbarten Kernorten erscheint.

Positionelle Änderungen der Replikationsmaschinerie fanden erst statt, nachdem ein Replikationsfokus circa 45-60 min einen gegebenen Kernort besetzte. Dieser Befund steht im Einklang mit der angenommenen Lebensdauer eines Replikationsfokus (Ma et al., 1998; Manders et al., 1992) und erklärt, weshalb während eines Zeitraums von 17 min (siehe oben) keine positionelle Änderungen beobachtet wurden.

4.3.3 Die Stabilität subchromosomaler Foci

In einer weiteren Serie von Experimenten wurde untersucht, wie die Replikationsmaschinerie mit Chromatin interagiert, das in der Mutterzelle während eines definierten Stadiums der S-Phase repliziert wurde. Dazu wurde die DNA der Mutterzelle replikationsmarkiert und gleichzeitig wurde das GFP-PCNA Expressionsplasmid mit eingeführt. In der darauffolgenden S-Phase wurde in den Tochterzellen untersucht, wie die Replikationsmaschinerie mit den markierten DNA-Foci interagierte.

Es ist bereits gezeigt worden, dass replikationsmarkierte DNA-Foci über mehrere Zellgenerationen hinweg stabil definierte Kernregionen besetzen (Dimitrova und Gilbert, 1999; Ferreira et al., 1997; Manders et al., 1999; Sadoni et al., 1999; Zink et al., 1999; Zink et al., 1998). In diesen Untersuchungen, die mit fixierten und lebenden Zellen durchgeführt worden sind, wurde unter anderem gezeigt, dass die Positionierung der DNA mit einem bestimmten Replikationszeitpunkt klonal von der Mutterzelle auf die Tochterzellen vererbt wird. Diese stabile Positionierung wird während der frühen G1-Phase etabliert und bleibt während den darauffolgenden Stadien der Interphase bestehen. Dieser Befund stimmt auch mit Lebendzellstudien überein, die gezeigt haben, dass replikationsmarkierte DNA in den meisten Fällen stabil mit ihren spezifischen Kernpositionen über einen Zeitintervall von mehreren Stunden assoziiert bleibt (Bornfleth et al., 1999; Zink et al., 1998). Zusätzlich ist das Verhalten von GFP-PCNA während des Zellzyklusses bereits analysiert worden (Leonhardt et al., 2000; Somanathan et al., 2001).

Aus diesem Grund konzentrierte sich die vorliegende Arbeit nicht auf Prozesse, die sich über den gesamten Zellzyklus hinweg ereigneten und auch nicht auf die Vererbung der replikationsmarkierten DNA-Muster. Stattdessen konzentrierten sich die Untersuchungen auf die Interaktion von GFP-PCNA-Foci mit markierter DNA während geeigneter Stadien der S-Phase. Diese Vorgehensweise erlaubte es, eine statistisch relevante Anzahl von Zellen aufzunehmen. Aufnahmen von Zellen während des gesamten Zellzyklusses wären nicht sehr informativ im Vergleich zu früheren Ergebnissen gewesen, und hätten eine statistische Analyse sehr schwierig gemacht, da die notwendigen experimentellen Prozeduren äußerst schwierig und extrem zeitaufwändig gewesen wären.

Aufgrund des Befundes, dass nach einmal erfolgter Replikationsmarkierung der DNA immer wieder fokale Muster in nachfolgenden Zellzyklus-Stadien und Zellgenerationen beobachtet wurden, wurde postuliert, dass die während der S-Phase in Replikationsfoci organisierte DNA stabile Aggregate bilden könnte (Berezney et al., 1995; Jackson und Pombo, 1998; Ma et al., 1998; Sparvoli et al., 1994; Zink et al., 1999; Zink et al., 1998). Bisher wurden Experimente mit hoch synchronisierten, doppelpulsmarkierten und fixierten Zellen durchgeführt, um die Stabilität entsprechender DNA-Aggregate zu untersuchen (Jackson und Pombo, 1998; Ma et al., 1998). Allerdings konnten durch diese Vorgehensweise keine quantitativen Daten bezüglich der zeitlichen und strukturellen Stabilität individueller Foci gewonnen werden. In der vorliegenden Arbeit konnten jedoch detaillierte quantitative Daten bezüglich der Stabilität von individuellen Foci gewonnen werden. Es wurde gezeigt, dass circa 85 % der DNA-Foci, die synchron in der Mutterzelle repliziert wurden, wieder zusammen in den Tochterzellen repliziert wurden. Dieses Ergebnis zeigt, dass 85 % der DNA-Foci stabil ihren Replikationszeitpunkt von S-Phase zu S-Phase beibehielten. Darüber hinaus konnte zusätzlich gezeigt werden, dass DNA-Foci mit einem unterschiedlichen Replikationszeitpunkt in der Mutterzelle in unterschiedliche DNA-Foci in den Tochterzellen organisiert waren (Abbildung 26), die stabil ihren Replikationszeitpunkt beibehielten. Diese Ergebnisse unterstützen sehr stark die Hypothese, dass Chromosomen in stabile strukturelle und funktionelle Einheiten organisiert sind, die äquivalent zu Replikationsfoci sind. Diese Einheiten wurden bereits früher von uns als subchromosomale Foci bezeichnet (Zink et al., 1998) und es wird geschätzt, dass sie einen DNA-Gehalt von circa 1 Mbp haben. Sie entsprechen wahrscheinlich Banden oder Sub-Banden von mitotischen Chromosomen, die ebenfalls einen definierten Replikationszeitpunkt besitzen (Jackson und Pombo, 1998; Sparvoli et al., 1994; Zink et al., 1999; Zink et al., 1998).

Ebenfalls zeigten die Daten, dass jeweils benachbarte Gruppen von diesen sogenannten subchromosomalen Foci während des Fortschreitens der S-Phase zeitlich aufeinander folgend aktiviert wurden. Diese Befunde zur sequentiellen Aktivierung benachbarter Foci stehen auch im Einklang mit kürzlich veröffentlichten Daten, bei denen die dynamischen Eigenschaften von GFP-PCNA-Foci mittels „Photobleaching“-Experimenten untersucht wurden (Sporbert et al., 2002). Es wurde bereits von verschiedenen Gruppen gezeigt, dass die räumliche Positionierung von DNA mit einem spezifischen Replikationszeitpunkt während der frühen G1-Phase etabliert wird (Dimitrova und Gilbert, 1999; Ferreira et al., 1997; Sadoni et al., 1999). Die Replikationsmaschinerie folgt nun während der S-Phase nicht-zufälligen Mustern subchromosomaler Foci (benachbarte Foci werden sequentiell aktiviert), deren räumliche Positionierung vorher während des Zellzyklusses etabliert worden ist. Daher ist die naheliegendste Schlussfolgerung aus den gesamten Daten, dass die Organisation der subchromosomalen Foci im Zellkern den zeitlich-räumlichen Verlauf der S-Phase bestimmt. Das entsprechende Modell zur Chromatinorganisation und zur räumlich-zeitlichen Organisation der S-Phase ist in Abbildung 28 und dem Film „Modell.avi“ (auf der beiliegenden CD) dargestellt.

Das Modell basiert auf einem Modell der Zellkernarchitektur, das bereits früher entwickelt worden war (Sadoni et al., 1999). Hierbei wird grundsätzlich von einem transkriptionell aktiven Kompartiment ausgegangen, welches sich im Inneren des Zellkerns befindet, die meisten aktiven Gene beinhaltet und früh-replizierend ist (Sadoni et al., 1999). Im Gegensatz dazu beinhaltet das transkriptionell inaktive Kompartiment, welches sich vorwiegend an den nukleären und nukleolären Peripherien befindet, keine aktiven Gene und ist später-replizierend (Sadoni et al., 1999). Diese Kompartimente werden durch die Aneinanderlagerung polarer Chromosomen-Territorien aufgebaut (Sadoni et al., 1999). Die einzelnen Chromosomen-Territorien sind in subchromosomale Foci organisiert, welche den R-Banden- oder G-/C-Banden mitotischer Chromosomen entsprechen. Ein wichtiger Aspekt des hier entwickelten Modells zur S-Phase Organisation ist, dass die replizierende und replizierte DNA keine großräumigen Umlagerungen im Kern zeigt. Während der S-Phase würden zunächst die sehr früh-replizierenden subchromosomalen Foci mit der Replikationsmaschinerie interagieren. Diese Foci, an denen die DNA-Replikation zuerst initiiert wird, müssten sich von den anderen Foci unterscheiden. Dieser Unterschied könnte zum Beispiel in einer besonders zugänglichen Chromatinstruktur bestehen, da diese Foci sich speziell in aktiv transkribierten Bereichen des Zellkerns befinden (Sadoni et al., 1999). Alternativ könnten sie sich auch durch ihre besondere Wechselwirkung mit der nukleären Matrix von anderen Foci unterscheiden (Jackson und Pombo, 1998). Anschließend würde eine sequentielle Aktivierung benachbarter Foci mit zunehmend späteren Replikationszeitpunkten erfolgen. Damit würde die Replikationsmaschinerie einer vorher etablierten räumlichen Ordnung von subchromosomalen Foci folgen.

Wie es zur jeweiligen Erkennung und Aktivierung benachbarter Foci durch die Replikationsmaschinerie kommen könnte, ist noch weitgehend ungeklärt. Möglicherweise spielt hierbei der von Sporbert et al. (2002) postulierte Domino-Effekt eine Rolle. Entsprechend dieser Hypothese führt der Prozess der DNA-Replikation zur Aktivierung benachbarter Orte im Zellkern. Hierbei könnten lokale Umlagerungen der DNA, wie sie in der vorliegenden Arbeit beobachtet wurden, eine Rolle spielen.

Auch andere Studien haben eine enge Beziehung zwischen der Kernpositionierung von chromosomalen Loci und der Koordination von S-Phase Ereignissen nahe gelegt (Dimitrova und Gilbert, 1999; Gilbert, 2001; Heun et al., 2001). Die kausalen Beziehungen sind allerdings nach wie vor unklar. Es ist bisher ungeklärt geblieben, ob die Kern-

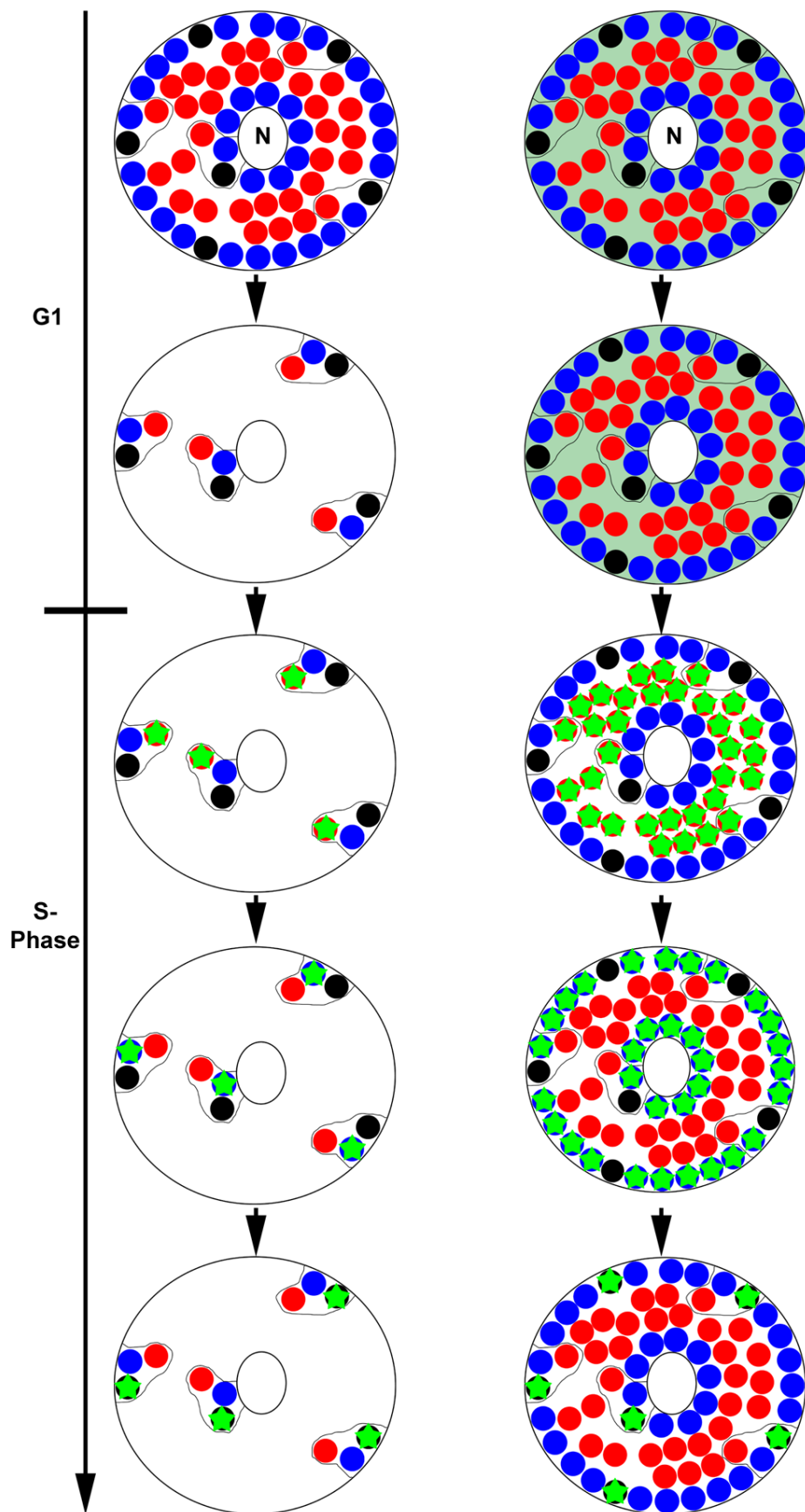


Abbildung 28

Modell zur Organisation des Chromatins und der S-Phase: die Replikationsmaschinerie folgt einem etablierten Pfad von subchromosomalen Foci während des zeitlichen Fortschreitens der S-Phase. Die

Abbildung zeigt schematisch einen Zellkern mit einem Nukleolus (N) und DNA, die in subchromosomale Foci organisiert ist. Die räumliche Organisation von subchromosomalen Foci mit einem definierten Replikationszeitpunkt (früh: rot, später: blau, spät: schwarz) wird während der frühen G1-Phase etabliert und während der Interphase stabil beibehalten (siehe auch (Sadoni et al., 1999)). Links sind individuelle Chromosomen-Territorien gezeigt, die in subchromosomale Foci organisiert sind. Der Einfachheit halber ist nur eine begrenzte Anzahl von individuellen Territorien gezeigt, die jeweils nur wenige subchromosomale Foci beinhalten (schätzungsweise haben subchromosomale Foci einen DNA-Gehalt von circa 1 Mbp (Berezney et al., 2000; Huberman and Tsai, 1973; Jackson and Pombo, 1998)). Während des Fortschreitens der S-Phase folgt die Replikationsmaschinerie (grüne Sterne zeigen Replikationsfoci an, während der G1-Phase ist GFP-PCNA gleichmäßig verteilt) einem etablierten Muster von subchromosomalen Foci und interagiert nacheinander mit benachbarten subchromosomalen Foci. Auf der Ebene des gesamten Kerns (rechts) resultiert dies in den typischen räumlich-zeitlichen Mustern der Replikationsfoci, die während der S-Phase beobachtet werden.

positionierung von chromosomalen Loci deren Replikationszeitpunkt bestimmt, oder ob chromosomale Einheiten mit einem definierten Replikationszeitpunkt spezifische Positionen im Zellkern einnehmen. Um diese kausalen Beziehungen weiter aufzuklären, wäre es in zukünftigen Studien wichtig, herauszufinden, wie die Positionierung von Chromatin im Zellkern determiniert wird.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Fragestellungen zur funktionellen und dynamischen Organisation des Kerns von Säugerzellen untersucht. Der erste Teil der Arbeit widmete sich der Frage, in welchem Zusammenhang die Synthese naszenter RNA mit der Organisation des Chromatins im Zellkern steht. Dabei wurde speziell untersucht, ob naszente RNA bevorzugt in chromatinarmen Räumen lokalisiert, wie es das Chromosomen-Territorien/Interchromatin-Kompartiment Modell (CT/IC-Modell) (Cremer und Cremer, 2001) vorhersagt. Diese Untersuchungen wurden an HeLa-Zellen durchgeführt, die stabil eine Fusion zwischen dem „Green Fluorescent Protein“ (GFP) und dem Histon H2B exprimierten (Kanda et al., 1998). Mit Hilfe dieses Fusionsproteins kann die Chromatinstruktur sehr gut dargestellt werden (Sadoni et al., 2001; Zink et al., 2003). Die naszente RNA wurde in diesen Zellen durch kurze Pulse von BrUTP markiert, das anschließend durch eine Immunfärbung nachgewiesen wurde. Die markierten Zellen wurden mit Hilfe hochauflösender konfokaler Laserscanning Mikroskopie aufgenommen. Für die Analyse der Bilddaten wurde eine Erosionsmethode entwickelt, welche die Auswertung der Daten unabhängig von subjektiv gewählten Schwellenwerten ermöglichte. Die Ergebnisse dieser Analysen zeigten keine bevorzugte Lokalisierung naszenter RNA in chromatinarmen Bereichen. Damit stützen die Ergebnisse nicht die entsprechenden Vorhersagen des ICD-Modells. Die hier gewonnenen Ergebnisse stehen nicht im Einklang mit den Ergebnissen anderer Studien (Politz et al., 1999; Verschure et al., 1999). Die unterschiedlichen Ergebnisse sind wahrscheinlich auf unterschiedliche Methoden zur Darstellung der Chromatinorganisation, beziehungsweise auf unterschiedliche Methoden zur Bildanalyse zurückzuführen.

Eine weitere Fragestellung, die im Zusammenhang mit der dynamischen Organisation der RNA-Synthese und RNA-Prozessierung in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde, war wie das Spleißfaktor-Kompartiment mit Chromatin interagiert. Diese Interaktion sollte in lebenden „Chinesischen Hamster Ovarien“ (CHO)-Zellen untersucht werden. Speziell sollte der Frage nachgegangen werden, ob das Spleißfaktor-Kompartiment unterschiedlich mit funktionell unterschiedlichen Chromatinfraktionen assoziiert ist. Dafür wurde die DNA dieser Chromatinfraktionen mit Hilfe von Cy3-dUTP (Zink et al., 1998; Zink et al., 2003) spezifisch markiert. Das Spleißfaktor-Kompartiment der lebenden Zellen wurde simultan mit einem hier lokalisierenden GFP-Fusionsprotein dargestellt (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. M. C. Cardoso, MDC, Berlin). Die so markierten lebenden Zellen wurden mit Hilfe der konfokalen Laserscanning Mikroskopie aufgenommen. Die Auswertung der Bilddaten ergab eine generelle enge Assoziation des Spleißfaktor-Kompartiments mit früh-replizierendem und transkriptionell aktivem Chromatin. Dagegen bestand eine solche Assoziation nicht mit spät-replizierendem und transkriptionell inaktivem Chromatin. Eine Behandlung der Zellen mit dem Transkriptions-Inhibitor α -Amanitin zeigte, dass die enge Assoziation des Spleißfaktor-Kompartiments mit früh-replizierendem und transkriptionell aktivem Chromatin direkt vom Prozess der Transkription abhängig war. Insgesamt zeigten die Daten zum ersten Mal, dass es in lebenden Zellen eine definierte Interaktion des Spleißfaktor-Kompartiments mit funktionell unterschiedlichen Chromatinfraktionen gibt, die abhängig ist vom Prozess der Transkription.

Ein weiterer dynamischer Prozess im Zellkern, der in der vorliegenden Arbeit an lebenden HeLa-Zellen untersucht werden sollte, war der Prozess der DNA-Replikation. Von besonderem Interesse war hierbei die Frage, welchen dynamischen Reorganisationen die DNA während der S-Phase unterliegt. Daneben sollte auch untersucht werden,

wie der spezifische zeitlich-räumliche Verlauf der S-Phase in Säugerzellen koordiniert wird. Zur Untersuchung dieser Fragen wurde die zu replizierende oder die naszente DNA lebender Zellen mit fluoreszenzmarkierten Nukleotiden dargestellt. Simultan wurde die Replikationsmaschinerie mit Hilfe eines GFP-PCNA Fusionsproteins markiert (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. M. C. Cardoso, MDC, Berlin). Diese Markierungstechniken erlaubten es zum ersten Mal, direkt die Interaktionen von replizierender DNA und der Replikationsmaschinerie zu beobachten und zu analysieren. Die Ergebnisse zeigten, dass die DNA während der S-Phase keine großräumigen Umlagerungen erfuhr. Nur einige lokal begrenzte Reorganisationen wurden beobachtet, die sich innerhalb von Distanzen von weniger als 1 μm abspielten. Die Ergebnisse zeigten ferner, dass DNA in stabile Aggregate organisiert war, die den Replikationsfoci entsprachen. 85 % dieser Aggregate, die auch als subchromosomale Foci bezeichnet werden (Zink et al., 1998), behielten ihren Replikationszeitpunkt von S-Phase zu S-Phase stabil bei. Während des zeitlichen Fortschreitens der S-Phase schritt die Replikationsmaschinerie sequentiell durch benachbarte Gruppen von subchromosomalen Foci. Diese besaßen einen definierten Replikationszeitpunkt, und lokalisierten an definierten Positionen im Zellkern. Diese Ergebnisse legten nahe, dass die spezifische Anordnung von subchromosomalen Foci im Kern, die während der frühen G1-Phase etabliert wird (Dimitrova und Gilbert, 1999; Ferreira et al., 1997; Sadoni et al., 1999), die räumlich-zeitliche Organisation der S-Phase determiniert.

6. Referenzen

- Abranches, R., A.F. Beven, L. Aragon-Alcaide, and P.J. Shaw. 1998. Transcription sites are not correlated with chromosome territories in wheat nuclei. *J Cell Biol.* 143: 5-12.
- Allison, D.C., and A.L. Nestor. 1999. Evidence for a relatively random array of human chromosomes on the mitotic ring. *J Cell Biol.* 145:1-14.
- Aten, J.A., P.J.M. Bakker, J. Stap, G.A. Boschmann, and C.H.N. Veenhof. 1992. DNA double labelling with IdUrd and CldUrd for spatial and temporal analysis of cell proliferation and DNA replication. *Histochemical J.* 24:251-259.
- Bachellerie, J.P., E. Puvion, and J.P. Zalta. 1975. Ultrastructural organization and biochemical characterization of chromatin - RNA - protein complexes isolated from mammalian cell nuclei. *Eur J Biochem.* 58:327-37.
- Beck, J.S. 1961. Variations in the morphological patterns of 'autoimmune' nuclear fluorescence. *Lancet.* June 3:1203-1205.
- Belmont, A.S., M.B. Braunfeld, J.W. Sedat, and D.A. Agard. 1989. Large-scale chromatin structural domains within mitotic and interphase chromosomes in vivo and in vitro. *Chromosoma.* 98:129-143.
- Belmont, A.S., and K. Bruce. 1994. Visualization of G1 chromosomes: a folded, twisted, supercoiled chromonema model of interphase chromatid structure. *J. Cell Biol.* 127:287-302.
- Belmont, A.S., G. Li, G. Sudlow, and C. Robinett. 1999. Visualization of large-scale chromatin structure and dynamics using the lac operator/lac repressor reporter system. *Methods Cell Biol.* 58:203-22.
- Berezney, R., and D.S. Coffey. 1974. Identification of a nuclear protein matrix. *Biochem Biophys Res Commun.* 60:1410-7.
- Berezney, R., and D.S. Coffey. 1975. Nuclear protein matrix: association with newly synthesized DNA. *Science.* 189:291-3.
- Berezney, R., D.D. Dubey, and J.A. Huberman. 2000. Heterogeneity of eukaryotic replicons, replicon clusters, and replication foci. *Chromosoma.* 108:471-84.
- Berezney, R., H. Ma, C. Meng, J. Samarabandu, and P.-C. Cheng. 1995a. Connecting Genomic Architecture and DNA Replication in Three Dimensions. *Zool. Stud.* 34:29-32.
- Berezney, R., M.J. Mortillaro, H. Ma, X. Wei, and J. Samarabandu. 1995b. The Nuclear Matrix: A Structural Milieu for Genomic Function. *Int. Rev. Cytol.* 162A:1-65.
- Blobel, G. 1985. Gene gating: a hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82:8527-8529.
- Bornfleth, H., P. Edelmann, D. Zink, T. Cremer, and C. Cremer. 1999. Quantitative motion analysis of subchromosomal foci in living cells using four-dimensional microscopy. *Biophysical Journal.* 77:2871-2886.
- Boveri, T. 1909. Die Blastomerenkerne von *Ascaris megalocephala* und die Theorie der Chromosomenindividualität. *Arch. Zellforschung.* 3:181.
- Boyle, S., S. Gilchrist, J.M. Bridger, N.L. Mahy, J.A. Ellis, and W.A. Bickmore. 2001. The spatial organization of human chromosomes within the nuclei of normal and emerin-mutant cells. *Hum Mol Genet.* 10:211-9.
- Bregman, D.B., L. Du, S. van der Zee, and S.L. Warren. 1995. Transcription-dependent redistribution of the large subunit of RNA polymerase II to discrete nuclear domains. *J Cell Biol.* 129:287-98.
- Bridger, J.M., S. Boyle, I.R. Kill, and W.A. Bickmore. 2000. Re-modelling of nuclear ar-

- chitecture in quiescent and senescent human fibroblasts. *Curr Biol.* 10:149-52.
- Caceres, J.F., T. Misteli, G.R. Screaton, D.L. Spector, and A.R. Krainer. 1997. Role of the modular domains of SR proteins in subnuclear localization and alternative splicing specificity. *J Cell Biol.* 138:225-38.
- Camargo, M., and J. Cervenka. 1982. Patterns of DNA Replication of Human Chromosomes. II. Replication Map and Replication Model. *Am. J. Hum. Genet.* 34: 757-780.
- Carter, K.C., K.L. Taneja, and J.B. Lawrence. 1991. Discrete nuclear domains of poly(A) RNA and their relationship to the functional organization of the nucleus. *J Cell Biol.* 115:1191-202.
- Chambon, P. 1974. RNA polymerases. In *The Enzymes*. Vol. 10. P.D. Boyer, editor. Academic Press, New York, NY. 261–331.
- Chandley, A.C., R.M. Speed, and A.R. Leitch. 1996. Different distributions of homologous chromosomes in adult human Sertoli cells and in lymphocytes signify nuclear differentiation. *J Cell Sci.* 109:773-6.
- Chubb, J.R., S. Boyle, P. Perry, and W.A. Bickmore. 2002. Chromatin motion is constrained by association with nuclear compartments in human cells. *Curr. Biol.* 12: 439-45.
- Cmarko, D., P.J. Verschure, T.E. Martin, M.E. Dahmus, S. Krause, X.D. Fu, R. van Driel, and S. Fakan. 1999. Ultrastructural analysis of transcription and splicing in the cell nucleus after bromo-UTP microinjection. *Mol Biol Cell.* 10:211-23.
- Comings, D.E. 1968. The rationale for an ordered arrangement of chromatin in the interphase nucleus. *Am J Hum Genet.* 20:440-60.
- Craig, J.M., and W.A. Bickmore. 1993. Chromosome Bands-Flavours to Savour. *Bio-Essays.* 15:349-354.
- Craig, J.M., and W.A. Bickmore. 1994. The distribution of CpG islands in mammalian chromosomes. *Nat. Genet.* 7:376-382.
- Cremer, T., and C. Cremer. 2001. Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nat. Rev. Genet.* 2:292-301.
- Cremer, T., C. Cremer, H. Baumann, E.-K. Luedtke, K. Sperling, V. Teuber, and C. Zorn. 1982. Rabl's Model of Interphase Chromosome Arrangement Tested in Chinese Hamster Cells by Premature Chromosome Condensation and Laser UV-Microbeam Experiments. *Hum. Genet.* 60:46-56.
- Cremer, T., S. Dietzel, R. Eils, P. Lichter, and C. Cremer. 1995. Chromosome territories, nuclear matrix filaments and inter-chromatin channels: a topological view on nuclear architecture and function. Royal Botanic Gardens, Kew. 63-81 pp.
- Cremer, T., G. Kreth, H. Koester, R.H.A. Fink, R. Heintzmann, M. Cremer, I. Solovei, D. Zink, and C. Cremer. 2000. Chromosome territories, interchromatin domain compartment and nuclear matrix: an integrated view of the functional nuclear architecture. *Crit. Rev. Eukaryotic Gene Expression.* 12:179-212.
- Cremer, T., A. Kurz, R. Zirbel, S. Dietzel, B. Rinke, E. Schroeck, M.R. Speicher, U. Mathieu, A. Jauch, P. Emmerich, H. Scherthan, T. Ried, C. Cremer, and P. Lichter. 1993. The role of chromosome territories in the functional compartmentalization of the cell nucleus. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 58:777-792.
- Cremer, T., P. Lichter, J. Borden, D.C. Ward, and L. Manuelidis. 1988. Detection of chromosome aberrations in metaphase and interphase tumor cells by in situ hybridization using chromosome-specific library probes. *Hum. Genet.* 80:235-246.
- Crissman, H.A., and G.T. Hirons. 1994. Staining of DNA in live and fixed cells. In *Me-*

- thods in Cell Biology. Vol. 41. Academic Press Inc. 195-209.
- Croft, J.A., J.M. Bridger, S. Boyle, P. Perry, P. Teague, and W.A. Bickmore. 1999. Differences in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus. *J. Cell Biol.* 145:1119-1131.
- De Boni, U., and A.H. Mintz. 1986. Curvilinear, three-dimensional motion of chromatin domains and nucleoli in neuronal interphase nuclei. *Science*. 234:863-6.
- Dimitrova, D.S., and D.M. Gilbert. 1999. The spatial position and replication timing of chromosomal domains are both established in early G1 phase. *Mol Cell*. 4:983-93.
- Dundr, M., T. Misteli, and M.O. Olson. 2000. The dynamics of postmitotic reassembly of the nucleolus. *J Cell Biol.* 150:433-46.
- Dutrillaux, B., J. Couturier, C.-L. Richer, and E. Viegas-Pequinot. 1976. Sequence of DNA replication in 277 R- and Q-bands of human chromosomes using a BrdU treatment. *Chromosoma*. 58:51-61.
- Eilbracht, J., and M.S. Schmidt-Zachmann. 2001. Identification of a sequence element directing a protein to nuclear speckles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:3849-54.
- Eils, R., S. Dietzel, E. Bertin, E. Schroeck, M.R. Speicher, T. Ried, M. Robert-Nicoud, C. Cremer, and T. Cremer. 1996. Three-dimensional reconstruction of painted human interphase chromosomes: active and inactive X chromosome territories have similar volumes but differ in shape and surface structure. *J. Cell Biol.* 135:1427-1440.
- Fakan, S., and W. Bernhard. 1971. Localisation of rapidly and slowly labelled nuclear RNA as visualized by high resolution autoradiography. *Exp Cell Res*. 67:129-41.
- Fakan, S., and P. Nobis. 1978. Ultrastructural localization of transcription sites and of RNA distribution during the cell cycle of synchronized CHO cells. *Exp Cell Res*. 113:327-37.
- Fakan, S., E. Puvion, and G. Sphor. 1976. Localization and characterization of newly synthesized nuclear RNA in isolate rat hepatocytes. *Exp Cell Res*. 99:155-64.
- Falk, M.M., and U. Lauf. 2001. High resolution, fluorescence deconvolution microscopy and tagging with the autofluorescent tracers CFP, GFP, and YFP to study the structural composition of gap junctions in living cells. *Microsc Res Tech*. 52:251-62.
- Fauth, C. 1998. Evaluierung eines Verfahrens zur Darstellung von Chromosomen in lebenden Säugetierzellen. In Institut für Anthropologie und Humangenetik. LMU, München. 1-102.
- Ferreira, J., G. Paoella, C. Ramos, and A.I. Lamond. 1997. Spatial organization of large-scale chromatin domains in the nucleus: a magnified view of single chromosome territories. *J Cell Biol.* 139:1597-1610.
- Francastel, C., D. Schuebeler, D.I.K. Martin, and M. Groudine. 2000. Nuclear compartmentalization and gene activity. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 1:137-143.
- Fu, X.D., and T. Maniatis. 1992. Isolation of a complementary DNA that encodes the mammalian splicing factor SC35. *Science*. 256(5056):535-8:535-8.
- Fu, X.-D., and T. Maniatis. 1990. Factor required for mammalian splicosome assembly is localized to discrete regions in the nucleus. *Nature*. 343:437-441.
- Galy, V., J.C. Olivo-Marin, H. Scherthan, V. Doye, N. Rascalou, and U. Nehrbass. 2000. Nuclear pore complexes in the organization of silent telomeric chromatin. *Nature*. 403:108-12.
- Gama-Carvalho, M., R.D. Krauss, L. Chiang, J. Valcarcel, M.R. Green, and M. Carmo-

- Fonseca. 1997. Targeting of U2AF65 to sites of active splicing in the nucleus. *J Cell Biol.* 137:975-87.
- Gasser, S.M. 2001. Positions of potential: nuclear organization and gene expression. *Cell.* 104:639-42.
- Gilbert, D.M. 2001. Nuclear position leaves its mark on replication timing. *J Cell Biol.* 152:F11-5.
- Gratzner, H.G. 1982. Monoclonal antibody to 5-Bromo- and 5-Iododeoxyuridine: a new reagent for detection of DNA replication. *Science.* 218:474-475.
- Harris, H. 1999. *The Birth of the Cell.* Yale University Press, New Haven.
- Hassig, C.A., and S.L. Schreiber. 1997. Nuclear histone acetylases and deacetylases and transcriptional regulation: HATs off to HDACs. *Curr. Opinion Chem. Biol.* 1: 300-308.
- Hendzel, M.J., M.J. Kruhlak, and D.P. Bazett-Jones. 1998. Organization of highly acetylated chromatin around sites of heterogeneous nuclear RNA accumulation. *Mol. Biol. Cell.* 9:2491-2507.
- Heun, P., T. Laroche, M.K. Raghuraman, and S.M. Gasser. 2001a. The positioning and dynamics of origins of replication in the budding yeast nucleus. *J Cell Biol.* 152: 385-400.
- Heun, P., T. Laroche, K. Shimada, P. Furrer, and S.M. Gasser. 2001b. Chromosome dynamics in the yeast interphase nucleus. *Science.* 294:2181-6.
- Hozak, P., A.B. Hassan, D.A. Jackson, and P.R. Cook. 1993. Visualization of Replication Factories Attached to a Nucleoskeleton. *Cell.* 73:361-373.
- Huberman, J.A., and A. Tsai. 1973. Direction of DNA replication in mammalian cells. *J Mol Biol.* 75:5-12.
- Jackson, D.A., P. Dickinson, and P.R. Cook. 1990. Attachment of DNA to the nucleoskeleton of HeLa cells examined using physiological conditions. *Nucleic Acids Res.* 18:4385-93.
- Jackson, D.A., A.B. Hassan, R.J. Errington, and P.R. Cook. 1993. Visualization of focal sites of transcription within human nuclei. *Embo J.* 12:1059-65.
- Jackson, D.A., and A. Pombo. 1998. Replicon Clusters Are Stable Units of Chromosome Structure: Evidence That Nuclear Organization Contributes to the Efficient Activation and Propagation of S Phase in Human Cells. *J. Cell Biol.* 140:1285-1295.
- Jeppesen, P. 1997. Histone acetylation: a possible mechanism for the inheritance of cell memory at mitosis. *BioEssays.* 19:67-74.
- Johnson, C., D. Primorac, M. McKinstry, J. McNeil, D. Rowe, and J.B. Lawrence. 2000. Tracking COL1A1 RNA in osteogenesis imperfecta. splice-defective transcripts initiate transport from the gene but are retained within the SC35 domain. *J Cell Biol.* 7:417-32.
- Kalejta, R.F., and J.L. Hamlin. 1997. The Dual Effect of Mimosine on DNA Replication. *Exp. Cell Res.* 231:173-183.
- Kanda, T., K.F. Sullivan, and G.M. Wahl. 1998. Histone-GFP fusion protein enables sensitive analysis of chromosome dynamics in living mammalian cells. *Curr. Biol.* 8:377-385.
- Kim, M.A., R. Johannsmann, and K.-H. Grzeschik. 1975. Giemsa staining of the sites replicating DNA early in human lymphocyte chromosomes. *Cytogenet. Cell Genet.* 15:363-371.
- Kondra, P.M., and M. Ray. 1978. Analysis of DNA replication patterns of human fibroblast chromosomes: the replication map. *Hum Genet.* 43:139-49.

- Kramer, J., Z. Zachar, and P.M. Bingham. 1994. Nuclear pre-mRNA metabolism: Channels and tracks. *Trends Cell Biol.* 4:35-37.
- Krause, S., S. Fakan, K. Weis, and E. Wahle. 1994. Immunodetection of poly(A) binding protein II in the cell nucleus. *Exp. Cell Res.* 214:75-82.
- Krude, T. 1999. Mimosine arrests proliferating human cells before onset of DNA replication in a dose-dependent manner. *Exp. Cell Res.* 247:148-59.
- Kruhlak, M.J., M.A. Lever, W. Fischle, E. Verdin, D.P. Bazett-Jones, and M.J. Hendzel. 2000. Reduced Mobility of the alternate splicing factor (ASF) through the nucleoplasm and steady state speckle compartments. *J Cell Biol.* 150:41-51.
- Kumaran, R.I., B. Muralikrishna, and V.K. Parnaik. 2002. Lamin A/C speckles mediate spatial organization of splicing factor compartments and RNA polymerase II transcription. *J Cell Biol.* 159:783-93.
- Kurz, A., S. Lampel, J.E. Nickolenko, J. Bradl, A. Benner, R.M. Zirbel, T. Cremer, and P. Lichter. 1996. Active and inactive genes localize preferentially in the periphery of chromosome territories. *J. Cell Biol.* 135:1195-1202.
- Lander, E.S., L.M. Linton, B. Birren, C. Nusbaum, M.C. Zody, J. Baldwin, K. Devon, K. Dewar, M. Doyle, W. FitzHugh, R. Funke, D. Gage, K. Harris, A. Heaford, J. Howland, L. Kann, J. Lehoczky, R. LeVine, P. McEwan, K. McKernan, J. Meldrim, J.P. Mesirov, C. Miranda, W. Morris, J. Naylor, C. Raymond, M. Rosetti, R. Santos, A. Sheridan, C. Sougnez, N. Stange-Thomann, N. Stojanovic, A. Subramanian, D. Wyman, J. Rogers, J. Sulston, R. Ainscough, S. Beck, D. Bentley, J. Burton, C. Clee, N. Carter, A. Coulson, R. Deadman, P. Deloukas, A. Dunham, I. Dunham, R. Durbin, L. French, D. Grafham, S. Gregory, T. Hubbard, S. Humphray, A. Hunt, M. Jones, C. Lloyd, A. McMurray, L. Matthews, S. Mercer, S. Milne, J.C. Mullikin, A. Mungall, R. Plumb, M. Ross, R. Shownkeen, S. Sims, R.H. Waterston, R.K. Wilson, L.W. Hillier, J.D. McPherson, M.A. Marra, E.R. Mardis, L.A. Fulton, A.T. Chinwalla, K.H. Pepin, W.R. Gish, S.L. Chissoe, M.C. Wendl, K.D. Delehaunty, T.L. Miner, A. Delehaunty, J.B. Kramer, L.L. Cook, R.S. Fulton, D.L. Johnson, P.J. Minx, S.W. Clifton, T. Hawkins, E. Branscomb, P. Predki, P. Richardson, S. Wenning, T. Slezak, N. Doggett, J.F. Cheng, A. Olsen, S. Lucas, C. Elkin, E. Uberbacher, M. Frazier, et al. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature.* 409:860-921.
- Larsson, S., J. Charlieu, K. Miyagawa, D. Engelkamp, M. Rassoulzadegan, A. Ross, F. Cuzin, V. van Heyningen, and N. Hastie. 1995. Subnuclear localization of WT1 in splicing or transcription factor domains is regulated by alternative splicing. *Cell.* 81:391-401.
- Leonhardt, H., H.-P. Rahn, P. Weinzierl, A. Sporbert, T. Cremer, D. Zink, and M.C. Cardoso. 2000a. Dynamics of DNA replication factories in living cells. *J Cell Biol.* 149:271-279.
- Leonhardt, H., A. Sporbert, and M.C. Cardoso. 2000b. Targeting regulatory factors to intranuclear replication sites. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 10:127-33.
- Lerner, E.A., M.R. Lerner, C.A. Janeway, Jr., and J.A. Steitz. 1981. Monoclonal antibodies to nucleic acid-containing cellular constituents: probes for molecular biology and autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 78:2737-41.
- Leung, A.K.L., and A.I. Lamond. 2002. In vivo analysis of NHPX reveals a novel nucleolar localization pathway involving a transient accumulation in splicing speckles. *JCB.* 157:615-629.
- Lewin, B. 1997. Genes VI. Oxford University Press. 1-1260 pp.
- Lewis, J.D., and D. Tollervey. 2000. Like attracts like: getting RNA processing together

- in the nucleus. *Science*. 288:1385-9.
- Li, H., and P.M. Bingham. 1991. Arginine/serine-rich domains of the su(wa) and tra RNA processing regulators target proteins to a subnuclear compartment implicated in splicing. *Cell*. 18:335-42.
- Lichter, P., T. Cremer, J. Borden, L. Manuelidis, and D.C. Ward. 1988. Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybridization using recombinant DNA libraries. *Hum. Genet.* 80: 224-234.
- Lindell, T.J., F. Weinberg, P.W. Morris, R.G. Roeder, and W.J. Rutter. 1970. Specific inhibition of nuclear RNA polymerase II by alpha-amanitin. *Science*. 170:447-9.
- Ma, H., J. Samarabandu, R.S. Devdhar, R. Acharya, P.-C. Cheng, C. Meng, and R. Berezney. 1998. Spatial and temporal dynamics of DNA replication sites in mammalian cells. *J. Cell Biol.* 143:1415-1425.
- Manders, E.M.M., H. Kimura, and P.R. Cook. 1999. Direct imaging of DNA in living cells reveals the dynamics of chromosome formation. *J. Cell Biol.* 144:813-821.
- Manders, E.M.M., J. Stap, G.J. Brakenhoff, R. van Driel, and J.A. Aten. 1992. Dynamics of three-dimensional replication patterns during S-phase, analysed by double labelling of DNA and confocal microscopy. *J. Cell Science*. 103:857-862.
- Manders, E.M.M., J. Stap, J. Strackee, R. van Driel, and J.A. Aten. 1996. Dynamic behaviour of DNA replication domains. *Exp. Cell Res.* 226:328-335.
- Markham, J., and J.A. Conchello. 2001. Artefacts in restored images due to intensity loss in three-dimensional fluorescence microscopy. *J Microsc.* 204:93-8.
- Marshall, W.F., A. Straight, J.F. Marko, J. Swedlow, A. Dernburg, A. Belmont, A.W. Murray, D.A. Agard, and J.W. Sedat. 1997. Interphase Chromosomes Undergo Constrained Diffusional Motion in Living Cells. *Current Biology*. 7:930-939.
- McNally, J.G., T. Karpova, J. Cooper, and J.A. Conchello. 1999. Three-dimensional imaging by deconvolution microscopy. *Methods*. 19:373-85.
- Melcak, I., S. Cermanova, K. Jirsova, K. Koberna, J. Malinsky, and I. Raska. 2000. Nuclear pre-mRNA compartmentalization: trafficking of released transcripts to splicing factor reservoirs. *Mol Biol Cell*. 11:497-510.
- Meng, C., and R. Berezney. 1991. Replicon cluster domains persist throughout the cell cycle of mouse 3T3 cells. *J. Cell Biol.* 115:95a.
- Mintz, P.J., S.D. Patterson, A.F. Neuwald, C.S. Spahr, and D.L. Spector. 1999. Purification and biochemical characterization of inernchromatin granule clusters. *EMBO J.* 18:4308-4320.
- Misteli, T. 2000. Cell biology of transcription and pre-mRNA splicing: nuclear architecture meets nuclear function. *J Cell Sci.* 113:1841-9.
- Misteli, T. 2001a. The concept of self-organization in cellular architecture. *J Cell Biol.* 155:181-5.
- Misteli, T. 2001b. Protein dynamics: implications for nuclear architecture and gene expression. *Science*. 291:843-7.
- Misteli, T., J.F. Caceres, and D.L. Spector. 1997. The dynamics of a pre-mRNA splicing factor in living cells. *Nature*. 387:523-527.
- Misteli, T., and D.L. Spector. 1999. RNA polymerase II targets pre-mRNA splicing factors to transcription sites in vivo. *Mol. Cell*. 3:697-705.
- Monneron, A., and W. Bernhard. 1969. Fine structural organization of the interphase nucleus in some mammalian cells. *J Ultrastruct Res.* 27:266-88.
- Mortillaro, M.J., B.J. Blencowe, X. Wei, H. Nakayasu, L. Du, S.L. Warren, P.A. Sharp, and R. Berezney. 1996. A hyperphosphorylated form of the large subunit of RNA

- polymerase II is associated with splicing complexes and the nuclear matrix. *PNAS*. 93:8253-8257.
- Münkel, C., R. Eils, S. Dietzel, D. Zink, C. Mehring, G. Wedemann, T. Cremer, and J. Langowski. 1999. Compartmentalization of interphase chromosomes observed in simulation and experiment. *J. Mol. Biol.* 285:1053-1065.
- Nagele, R., T. Freeman, L. McMorrow, and H.Y. Lee. 1995. Precise spatial positioning of chromosomes during prometaphase: evidence for chromosomal order. *Science*. 270:1831-5.
- Nakamura, H., T. Morita, and C. Sato. 1986. Structural organizations of replicon domains during DNA synthetic phase in the mammalian nucleus. *Exp. Cell Res.* 165:291-297.
- Nakayasu, H., and R. Berezney. 1989. Mapping Replicational Sites in the Eucaryotic Cell Nucleus. *J. Cell Biol.* 108:1-11.
- Nelson, W.G., K.J. Pienta, E.R. Barrack, and D.S. Coffey. 1986. The role of the nuclear matrix in the organization and function of DNA. *Annu Rev Biophys Biophys Chem.* 15:457-75.
- O'Keefe, R.T., S.C. Henderson, and D.L. Spector. 1992. Dynamic Organization of DNA Replication in Mammalian Cell Nuclei: Spatially and Temporally Defined Replication of Chromosome-specific α -Satellite DNA Sequences. *J. Cell Biol.* 116:1095-1110.
- Olins, A.L., D.E. Olins, W.W. Franke, H.J. Lipps, and D.M. Prescott. 1981. Stereo-electron microscopy of nuclear structure and replication in ciliated protozoa (Hypotricha). *Eur J Cell Biol.* 25:120-30.
- Olins, A.L., D.E. Olins, H. Zentgraf, and W.W. Franke. 1980. Visualization of nucleosomes in thin sections by stereo electron microscopy. *J Cell Biol.* 87:833-6.
- Pardoll, D.M., B. Vogelstein, and D.S. Coffey. 1980. A fixed site of DNA replication in eucaryotic cells. *Cell*. 19:527-536.
- Parvinen, M., and K.O. Soderstrom. 1976. Chromosome rotation and formation of synapsis. *Nature*. 260:534-5.
- Passarge, E. 1994. Taschenatlas der Genetik. Thieme, Stuttgart. 1-406 pp.
- Pederson, T. 1999. Movement and localization of RNA in the cell nucleus. *FASEB J.* 13:238-42.
- Perraud, M., M. Gioud, and J.C. Monier. 1979. [Intranuclear structures of monkey kidney cells recognised by immunofluorescence and immuno-electron microscopy using anti-ribonucleoprotein antibodies (author's transl)]. *Ann Immunol (Paris)*. 130C:635-47.
- Politz, J.C., R.A. Tuft, T. Pederson, and R.H. Singer. 1999. Movement of nuclear poly(A) RNA throughout the interchromatin space in living cells. *Curr. Biol.* 9:285-291.
- Pombo, A., D.A. Jackson, M. Hollinshead, Z. Wang, R.G. Roeder, and P.R. Cook. 1999. Regional specialization in human nuclei: visualization of discrete sites of transcription by RNA polymerase III. *EMBO J.* 18:2241-53.
- Puck, T.T., S.J. Cieciura, and A. Robinson. 1958. Genetics of somatic mammalian cells. *J. Exp. Med.* 108:945-956.
- Rabl, C. 1885. Ueber Zelltheilung. *Morphol. Jahrbuch*. 10.
- Razin, S.V., and I.I. Gromova. 1995. The channels model of nuclear matrix structure. *Bioessays*. 17:443-450.
- Richmond, T.J., J.T. Finch, B. Rushton, D. Rhodes, and A. Klug. 1984. Structure of the nucleosome core particle at 7 Å resolution. *Nature*. 311:532-7.

- Ross, R.A. 1983. Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 71:741-747.
- Saccone, S., S. Caccio, J. Kusuda, L. Andreozzi, and G. Bernardi. 1996. Identification of the gene-richest bands in human chromosomes. *Gene*. 174:85-94.
- Saccone, S., A. De Sario, G. Della Valle, and G. Bernardi. 1992. The highest gene concentrations in the human genome are in T bands of metaphase chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89:4913-4917.
- Saccone, S., A. De Sario, J. Wiegant, A.K. Raap, G. Della Valle, and G. Bernardi. 1993. Correlations between isochores and chromosomal bands in the human genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90:11929-11933.
- Sadoni, N., S. Langer, C. Fauth, G. Bernardi, T. Cremer, B.M. Turner, and D. Zink. 1999. Nuclear organization of mammalian genomes. Polar chromosome territories build up functionally distinct higher order compartments. *J. Cell Biol.* 146: 1211-1226.
- Sadoni, N., K.F. Sullivan, P. Weinzierl, E. Stelzer, and D. Zink. 2001. Large-scale chromatin fibers of living cells display a discontinuous functional organization. *Chromosoma*. 110:39-51.
- Sadoni, N., C. Cardoso, E.H.K. Stelzer, H. Leonhardt, and D. Zink. 2003. Stable chromosomal units determine the spatial and temporal organization of DNA replication. *submitted*.
- Schardin, M., T. Cremer, H.D. Hager, and M. Lang. 1985. Specific staining of human chromosome position in chinese hamster x man hybrid cell lines demonstrates interphase chromosome territories. *Hum. Genet.* 71:281-287.
- Scherer, F.W., J.T. Syverton, and G.O. Gey. 1953. Studies on the propagation in vitro of polyomyelitis viruses. *J. Exp. Med.* 97:695-710.
- Schermelleh, L., I. Solovei, D. Zink, and T. Cremer. 2001. Two-color fluorescence labeling of early and mid-to-late replicating chromatin in living cells. *Chromosome Res.* 9:77-80.
- Schul, W., R. van Driel, and L. de Jong. 1998. A subset of poly(A) polymerase is concentrated at sites of RNA synthesis and is associated with domains enriched in splicing factors and poly(A) RNA. *Exp Cell Res.* 238:1-12.
- Sedat, J., and L. Manuelidis. 1978. A direct approach to the structure to eucaryotic chromosomes. *Cold Spring Harbour Symp Quant Biol.* 42:331-350.
- Smith, K.P., P.T. Moen, K.L. Wydner, J.R. Coleman, and J.B. Lawrence. 1999. Processing of endogenous pre-mRNAs in association with SC-35 domains is gene specific. *J Cell Biol.* 144:617-29.
- Solovei, I., D. Kienle, G. Little, R. Eils, L. Savelyeva, M. Schwab, W. Jager, C. Cremer, and T. Cremer. 2000. Topology of double minutes (dmins) and homogeneously staining regions (HSRs) in nuclei of human neuroblastoma cell lines. *Genes Chromosomes Cancer*. 29:297-308.
- Somanathan, S., T.M. Suchyna, A.J. Siegel, and R. Berezney. 2001. Targeting of PCNA to sites of DNA replication in the mammalian cell nucleus. *J Cell Biochem.* 81: 56-67.
- Sparvoli, E., M. Levi, and E. Rossi. 1994. Replication clusters may form structurally stable complexes of chromatin and chromosomes. *J. Cell Sci.* 107:3097-3103.
- Spector, D.L. 1990. Higher order nuclear organization: three-dimensional distribution of small nuclear ribonucleoprotein particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 87:147-151.
- Spector, D.L. 1993a. Macromolecular domains within the cell nucleus. *Annu Rev Cell*

- Biol.* 9:265-315.
- Spector, D.L. 1993b. Nuclear organization of pre-mRNA processing. *Curr Opin Cell Biol.* 5:442-7.
- Spector, D.L., X.D. Fu, and T. Maniatis. 1991. Associations between distinct pre-mRNA splicing components and the cell nucleus. *EMBO J.* 10:3467-81.
- Spector, D.L., W.H. Schrier, and H. Busch. 1983. Immunoelectron microscopic localization of snRNPs. *Biol Cell.* 49:1-10.
- Sporbert, A., A. Gahl, R. Ankerhold, H. Leonhardt, and M.C. Cardoso. 2002. DNA polymerase clamp shows little turnover at established replication sites but sequential de novo assembly at adjacent origin clusters. *Mol Cell.* 10:1355-65.
- Sun, H.B., J. Shen, and H. Yokota. 2000. Size-dependent positioning of human chromosomes in interphase nuclei. *Biophys. J.* 79:184-190.
- Tumbar, T., G. Sudlow, and A.S. Belmont. 1999. Large-scale chromatin unfolding and remodeling induced by VP16 acidic activation domain. *J. Cell Biol.* 145:1341-1354.
- Utle, R.T., K. Ikeda, P.A. Grant, J. Cote, D.J. Steger, A. Eberharter, S. John, and J.L. Workman. 1998. Transcriptional activators direct histone acetyltransferase complexes to nucleosomes. *Nature.* 394:498-502.
- Venter, J.C., M.D. Adams, E.W. Myers, P.W. Li, R.J. Mural, G.G. Sutton, H.O. Smith, M. Yandell, C.A. Evans, R.A. Holt, J.D. Gocayne, P. Amanatides, R.M. Ballew, D.H. Huson, J.R. Wortman, Q. Zhang, C.D. Kodira, X.H. Zheng, L. Chen, M. Skupski, G. Subramanian, P.D. Thomas, J. Zhang, G.L. Gabor Miklos, C. Nelson, S. Broder, A.G. Clark, J. Nadeau, V.A. McKusick, N. Zinder, A.J. Levine, R.J. Roberts, M. Simon, C. Slayman, M. Hunkapiller, R. Bolanos, A. Delcher, I. Dew, D. Fasulo, M. Flanigan, L. Florea, A. Halpern, S. Hannenhalli, S. Kravitz, S. Levy, C. Mobarry, K. Reinert, K. Remington, J. Abu-Threideh, E. Beasley, K. Biddick, V. Bonazzi, R. Brandon, M. Cargill, I. Chandramouliswaran, R. Charlab, K. Chaturvedi, Z. Deng, V. Di Francesco, P. Dunn, K. Eilbeck, C. Evangelista, A.E. Gabrielian, W. Gan, W. Ge, F. Gong, Z. Gu, P. Guan, T.J. Heiman, M.E. Higgins, R.R. Ji, Z. Ke, K.A. Ketchum, Z. Lai, Y. Lei, Z. Li, J. Li, Y. Liang, X. Lin, F. Lu, G.V. Merkulov, N. Milshina, H.M. Moore, A.K. Naik, V.A. Narayan, B. Nee-lam, D. Nusskern, D.B. Rusch, S. Salzberg, W. Shao, B. Shue, J. Sun, Z. Wang, A. Wang, X. Wang, J. Wang, M. Wei, R. Wides, C. Xiao, C. Yan, et al. 2001. The sequence of the human genome. *Science.* 291:1304-51.
- Verschure, P.J., I. van der Kraan, E.M.M. Manders, and R. van Driel. 1999. Spatial relationship between transcription sites and chromosome territories. *J. Cell Biol.* 147:13-24.
- Visser, A.E., F. Jaunin, S. Fakan, and J.A. Aten. 2000. High resolution analysis of interphase chromosome domains. *J. Cell Science.* 113:2585-2593.
- Vogel, F., and T.M. Schroeder. 1974. The internal order of the interphase nucleus. *Hu-mangenetik.* 25:265-97.
- Waga, S., and B. Stillman. 1994. Anatomy of a DNA replication fork revealed by reconstitution of SV40 DNA replication in vitro. *Nature.* 369:207-12.
- Walter, J., L. Schermelleh, M. Cremer, S. Tashiro, and T. Cremer. 2003. Chromosome order in HeLa cells changes during mitosis and early G1, but is stably maintained during subsequent interphase stages. *JCB.* 160:685-697.
- Wang, J., L.G. Cao, Y.L. Wang, and T. Pederson. 1991. Localization of pre-messenger RNA at discrete nuclear sites. *PNAS.* 88:7391-5.
- Wansink, D.G., E.E. Manders, I. van der Kraan, J.A. Aten, R. van Driel, and L. de Jong.

- 1994a. RNA polymerase II transcription is concentrated outside replication domains throughout S-phase. *J Cell Sci.* 107:1449-56.
- Wansink, D.G., W. Schul, I. van der Kraan, B. van Steensel, R. van Driel, and L. de Jong. 1993. Fluorescent labeling of nascent RNA reveals transcription by RNA polymerase II domains scattered throughout the nucleus. *J. Cell Biol.* 122:283-293.
- Wansink, D.G., R. van Driel, and L. de Jong. 1994b. Organization of (pre-)mRNA metabolism in the cell nucleus. *Mol. Biol. Rep.* 20:45-55.
- Waterston, R.H., K. Lindblad-Toh, E. Birney, J. Rogers, J.F. Abril, P. Agarwal, R. Agarwala, R. Ainscough, M. Alexandersson, P. An, S.E. Antonarakis, J. Attwood, R. Baertsch, J. Bailey, K. Barlow, S. Beck, E. Berry, B. Birren, T. Bloom, P. Bork, M. Botcherby, N. Bray, M.R. Brent, D.G. Brown, S.D. Brown, C. Bult, J. Burton, J. Butler, R.D. Campbell, P. Carninci, S. Cawley, F. Chiaromonte, A.T. Chinwalla, D.M. Church, M. Clamp, C. Clee, F.S. Collins, L.L. Cook, R.R. Copley, A. Coulson, O. Couronne, J. Cuff, V. Curwen, T. Cutts, M. Daly, R. David, J. Davies, K.D. Delehaunty, J. Deri, E.T. Dermitzakis, C. Dewey, N.J. Dickens, M. Diekhans, S. Dodge, I. Dubchak, D.M. Dunn, S.R. Eddy, L. Elnitski, R.D. Emes, P. Eswara, E. Eyra, A. Felsenfeld, G.A. Fewell, P. Flicek, K. Foley, W.N. Frankel, L.A. Fulton, R.S. Fulton, T.S. Furey, D. Gage, R.A. Gibbs, G. Glusman, S. Gnerre, N. Goldman, L. Goodstadt, D. Grafham, T.A. Graves, E.D. Green, S. Gregory, R. Guigo, M. Guyer, R.C. Hardison, D. Haussler, Y. Hayashizaki, L.W. Hillier, A. Hinrichs, W. Hlavina, T. Holzer, F. Hsu, A. Hua, T. Hubbard, A. Hunt, I. Jackson, D.B. Jaffe, L.S. Johnson, M. Jones, T.A. Jones, A. Joy, M. Kamal, E.K. Karlsson, et al. 2002. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature.* 420:520-62.
- Wenzel, A., C. Cziepluch, U. Hamann, J. Schuermann, and M. Schwab. 1991. The N-Myc oncoprotein is associated in vivo with the phosphoprotein Max(p20/22) in human neuroblastoma cells. *EMBO J.* 10:3703-3712.
- Woodcock, C.L. 1994. Chromatin fibers observed in situ in frozen hydrated sections. Native fiber diameter is not correlated with nucleosome repeat length. *J. Cell Biol.* 125:11-19.
- Woodcock, C.L.F., L.L.Y. Frado, and J.B. Rattner. 1984. The higher-order structure of chromatin: evidence for a helical ribbon arrangement. *J. Cell Biol.* 99:42-52.
- Wyman, C., and M. Botchan. 1995. DNA replication. A familiar ring to DNA polymerase processivity. *Curr Biol.* 5:334-7.
- Xing, Y., C.V. Johnson, P.T.J. Moen, J.A. McNeil, and J. Lawrence. 1995. Nonrandom gene organization: structural arrangements of specific pre-mRNA transcription and splicing with SC-35 domains. *J. Cell Biol.* 131:1635-1647.
- Zbarskii, I.B. 1948. Property of nonhistone proteins of the cell nucleus to form non-chromatin structural carcass (nuclear matrix). *State Committee of the USSR on Inventions and Discoveries, No. 348, Moscow, August 27.*
- Zbarskii, I.B., and S.S. Debov. 1948. On the proteins of the cell nucleus. *Dokl. Akad. Nauk. SSSR* 63:795-798.
- Zeng, C., E. Kim, S.L. Warren, and S.M. Berget. 1997. Dynamic relocation of transcription and splicing factors dependent upon transcriptional activity. *EMBO J.* 16:1401-1412.
- Zink, D. 2001. Live-Cell Microscopy of Single Nuclear Chromosomes and Genome Compartments: Evaluation of Labeling Procedure and Imaging Conditions. *Cytometry.* 45:214-224.

- Zink, D., A. Bolzer, C. Mayr, W. Hofmann, N. Sadoni, and K. Ueberla. 2001. Mammalian genome organization and its implications for the development of gene therapy vectors. *Gene Ther Mol Biol.* 6:1-24.
- Zink, D., H. Bornfleth, A. Visser, C. Cremer, and T. Cremer. 1999. Organization of early and late replicating DNA in human chromosome territories. *Exp. Cell Res.* 247: 176-188.
- Zink, D., T. Cremer, R. Saffrich, R. Fischer, M.F. Trendelenburg, W. Ansorge, and E.H.K. Stelzer. 1998. Structure and dynamics of human interphase chromosome territories in vivo. *Hum. Genet.* 102:241-251.
- Zink, D., N. Sadoni, and E. Stelzer. 2003. Visualizing chromatin and chromosomes in living cells. *Methods.* 29:42-50.
- Zink, D., M.D. Amaral, S. Lang, L.A. Clarke, F. Alt, A.K. Norek, K. Hochreuther, C. Rudolph, N. Sadoni, A. Englmann, S. Christan, J. Rosenecker, and D. Schindelhauer. 2003. Adjacent genes from the human CFTR-region individually localize in functionally appropriate nuclear regions. *submitted*.
- Zirbel, R.M., U.R. Mathieu, A. Kurz, T. Cremer, and P. Lichter. 1993. Evidence for a nuclear compartment of transcription and splicing located at chromosome domain boundaries. *Chromosome Res.* 1:93-106.

7. Abkürzungen

µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromol
3D	Dreidimensional
BrdU	5-Bromo-2'-Desoxyuridin
BrUTP	5-Bromouridine 5'-Triphosphate
BSA	Bovine Serum Albumin
CHO	Chinesische Hamster Ovarien
CLSM	Konfokales Laser Scanning Mikroskop
CMF-PBS	Calcium-Magnesium-freies PBS
CMV	Cytomegalievirus
CT/IC	Chromosomen-Territorien/Interchromatin-Kompartiment
Cy3-dUTP	5-Amino-propargyl-2'-Deoxy-Uridin-5'-Triphosphat mit Cy3-Fluorochrom
Cy5-dUTP	5-Amino-propargyl-2'-Deoxy-Uridin-5'-Triphosphat mit Cy5-Fluorochrom
DAPI	4-6-Diamidino-2-phenylindole
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dtra	transformer (aus Drosophila)
E. coli	Escherichia coli
EM	Elektronenmikroskopie
FA	Formaldehyd
FITC-dUTP	Fluorescein-12-2'-deoxy-Uridin-5'-Triphosphat
FRAP	Fluorescence Recovery After Photobleaching
g	Gramm
GFP	Grünes fluoreszierendes Protein
h	Stunde
H2B	Histon H2B
H ₂ O	Wasser
HMG	High Mobility Group
IC	Interchromatin-Kompartiment
ICD	Interchromosomen-Domänen
Kb	Kilobasenpaare
LSM	Laser Scanning Mikroskop
M	Mol
Mbp	Meagbasenpaare
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol
ms	Millisekunde
MW	Molekulargewicht
NA	numerische Aperatur
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
rDNA	ribosomale DNA
RF	Replikationsfokus

RFC	Replikation Faktor C
ROI	Region of Interest
RPA	Replikation Protein A
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SF	subchromosomaler Fokus
SFC	Spleißfaktor-Kompartiment
SV40	Simian Virus 40
TRITC	Tetramethyl-Rhodaminisothiocyanat

8. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Frau PD Dr. Daniele Zink für die Übernahme des Erstgutachtens, ihre stete Diskussionsbereitschaft und ihre Mühen bei der Korrektur dieser Arbeit bedanken. Außerdem möchte ich Ihr für die vielen praxistauglichen Tipps und die vielen Freiheiten beim Erstellen dieser Arbeit danken.

Herrn Prof. Dr. Dirk Eick sei an dieser Stelle für die Übernahme des Zweitgutachtens und für sein dafür aufgebrachtes Engagement gedankt.

Dr. Ernst Stelzer gilt mein Dank für die Aufenthalte am EMBL, das Benutzen der konfokalen Laserscanning-Mikroskope und seine Hilfe bei den statistischen Auswertungen.

Dr. Carsten Rudolph gebührt ebenfalls Dank für seine geduldige Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Prof. Dr. Kevin Sullivan gilt mein Dank für die Bereitstellung der HeLa H2B-GFP-Zellen.

Dr. Cristina Cardoso und Prof. Dr. Heinrich Leonhardt gebührt Dank für die Bereitstellung der dtra-GFP- und GFP-PCNA-Konstrukte.

Bei Joachim Walter möchte ich mich für seine Hilfe am LSM 410 und das Programmieren der Makros dort bedanken. Diese haben die Lebendzellbeobachtung leichter und anwenderfreundlich gemacht.

Lothar Schermelleh gebührt Dank für das Zeigen der Scratch-Labeling-Technik.

Bei Andi, Elena, Jeannette, Kathrin und Susanne möchte ich mich für die Zusammenarbeit in Labor, Zellkultur und Büro bedanken.

Bei meiner Frau Martina und meinen beiden Töchtern Lara und Lillian möchte ich mich ganz besonders für die Zeit nach der Arbeit und ihre Geduld bedanken.

Bei meinen Eltern für die Ermöglichung des Studiums und ihre finanzielle Unterstützung.

An dieser Stelle möchte ich auch Peter Weinzierl gedenken, mit dem wir einen sehr beliebten und hoch geschätzten Kollegen verloren haben.

9. Lebenslauf

Name: Nicolas Sadoni
Geburtsdatum: 24.11.1971
Geburtsort: München
Familienstand: verheiratet, 2 Töchter

Schulausbildung:

09 / 78 – 07 / 82 Grundschole Türkenschule in der Türkenstraße, München
09 / 82 – 07 / 88 Oskar-von-Miller-Gymnasium, München
08 / 88 – 07 / 89 einjähriger Aufenthalt an der Lancaster Highschool, Ohio, USA
09 / 89 – 07 / 91 Oskar-von-Miller-Gymnasium, München
07 / 91 Erlangung der allgemeinen Hochschulreife

Zivildienst:

09 / 91 – 10 / 92 Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit (GSF), Neuherberg bei Frau Prof. Eckhardt-Schupp

Hochschulausbildung:

11 / 92 - 10 / 95 Diplom-Studium Biologie an der TU München, Abschluss Vordiplom: 1995
11 / 95 – 03 / 99 Diplom-Studium Biologie an der LMU München, Abschluss Diplom: 03/99
seit 04 / 99 Promotionsstudium am Department Biologie II (ehem. Institut für Anthropologie und Humangenetik) der LMU München

Vorträge und Kurse:

11 / 2000 Vortrag „*The process of replication in the context of stably positioned chromatin*“ bei Symposium „Higher-Order Structure of Cell Nuclei and Genetic Effects of Radiation“ in Val-tice, Tschechien
11 / 2000 Coach bei DFG-Schwerpunkt „Functional Architecture of the Nucleus“, Workshop on Live Cell Imaging am Max-Del-brück-Centrum (MDC) in Berlin
05 / 2001 Coach bei EMBO-Kurs „Practical Course on Live Specimen Light Microscopy“ in Heidelberg
06 / 2003 Vortrag „The topological relationships between nascent RNA synthesis and chromatin organization in nuclei of HeLa cells“ bei FASEB Summer Research Conference „Nuclear Structure and Cancer“ in Saxtons River; Vermont, USA

Besondere Aufgaben:

seit 2000 Verantwortlich für Bildanalyse, Systemadministration, Netzwerkadministration und Benutzerbetreuung in der Arbeitsgruppe

Veröffentlichungen:

- Sadoni, N.**, S. Langer, C. Fauth, G. Bernardi, T. Cremer, B.M. Turner, and D. Zink. 1999. Nuclear organization of mammalian genomes: polar chromosome territories build up functionally distinct higher order compartments. *J. Cell Biol.* 146:1211-1226.
- Sadoni, N.**, K.F. Sullivan, P. Weinzierl, E. Stelzer, and D. Zink. 2001. Large-scale chromatin fibers of living cells display a discontinuous functional organization. *Chromosoma*. 110:39-51.
- Zink, D., A. Bolzer, C. Mayr, W. Hofmann, **N. Sadoni**, and K. Ueberla. 2001. Mammalian genome organization and its implications for the development of gene therapy vectors. *Gene Ther Mol Biol.* 6:1-24.
- Zink, D., **N. Sadoni**, and E. Stelzer. 2003. Visualizing chromatin and chromosomes in living cells. *Methods*. 29:42-50.
- Sadoni, N.**, C. Cardoso, E.H.K. Stelzer, H. Leonhardt, and D. Zink. 2003. Stable chromosomal units determine the spatial and temporal organization of DNA replication. *submitted*.
- Zink, D., M.D. Amaral, S. Lang, L.A. Clarke, F. Alt, A.K. Norek, K. Hochreuther, C. Rudolph, **N. Sadoni**, A. Englmann, S. Christan, J. Rosenecker, and D. Schindelhauer. 2003. Adjacent genes from the human CFTR-region individually localize in functionally appropriate nuclear regions. *submitted*.

